

ISOLEMENT ET CARACTÉRISATION DE LA RÉSISTANCE AUX
MÉTAUX DE CHAMPIGNONS ENDOPHYTES DE
L'AULNE RUGUEUX ET DE L'AULNE CRISPÉ

par

Steve Lalancette

Mémoire présenté à la faculté des Sciences en vue de
l'obtention du grade de maître ès (M.Sc.)

FACULTÉ DES SCIENCES
UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE

Sherbrooke, Québec, Canada, 24 juillet 2018

Le 24 juillet 2018

*Le jury a accepté le mémoire de Monsieur Steve Lalancette
dans sa version finale*

Membres du jury

Professeure Carole Beaulieu
Directrice de recherche
Département de biologie

Professeur Sébastien Roy
Co-directeur de recherche
Département de Biologie

Professeur Robert Bradley
Évaluateur interne
Département de biologie

Professeur Pascale Beauregard
Président-rapporteur
Département de biologie

SOMMAIRE

La présence de métaux dans la solution du sol peut engendrer diverses réactions de toxicité chez les plantes, et lorsqu'absorbés par ces dernières, se propager dans la chaîne alimentaire. La phytostabilisation permet, à l'aide de divers processus biologiques, de modifier la forme chimique des métaux ou d'en fixer les ions afin d'en diminuer la toxicité, tout en les maintenant dans le sol, évitant ainsi leur translocation. À ce titre, les endophytes fongiques des plantes peuvent jouer un rôle clé dans l'établissement d'un couvert végétal en milieu contaminé par deux mécanismes, soit en diminuant la toxicité de la solution du sol et en favorisant la mobilisation d'éléments nutritifs par la plante.

Cette étude, ayant pour but principal d'isoler, identifier et caractériser des endophytes fongiques pouvant être utilisés dans des stratégies de phytostabilisation basées sur l'aune, comporte trois objectifs spécifiques de recherche. Le premier consiste à prélever, isoler et identifier des endophytes fongiques de l'aulne crispé et de l'aulne rugueux, provenant de milieux contaminés aux métaux ou perturbés, et valider leur statut d'endophyte. Le deuxième est de mesurer la tolérance relative de ces isolats au cuivre, au nickel, au zinc, à l'arsenic et à divers pH acides. Le troisième vise à mesurer la croissance d'aulnes inoculés avec ces mêmes endophytes par rapport à des aulnes non inoculés en présence de matière organique.

Cette étude a permis d'identifier vingt champignons comme endophytes de l'aulne. Ces endophytes, à l'exception de deux souches, ont tous été identifiés comme des champignons pseudomycorhiziens appartenant à l'ordre des *Helotiales* chez les Ascomycètes. Notons que deux genres parmi eux, *Rhizoscyphus* et *Cryptosporipsis*,

ont été identifiés comme endophyte de l'aulne pour la première fois. Les deux autres souches ont été identifiées comme des champignons ectomycorhiziens Basidiomycètes appartenant aux genres *Tomentella* et *Sebacina*, déjà connus comme endophytes de l'aulne. Aucune souche isolée n'a affiché une tolérance importante à toutes les conditions testées. Cependant, les champignons appartenant à l'ordre des *Helotiales* ont montré une plus grande tolérance au nickel, au zinc et aux pH acides que les champignons basidiomycètes. Une part importante des souches fongiques ont également montré une stimulation de leur croissance lorsqu'exposées à une concentration de 50 mg/L d'arsenic. Finalement, l'inoculation des aulnes avec les souches isolées ont donné des résultats divergents, certaines souches favorisant la croissance alors que d'autres se sont d'avantages comportées comme des parasites.

L'isolement de champignons de type principalement pseudomycorhizien s'apparente aux résultats d'autres études faites sur des communautés fongiques en milieux contaminés, bien que peu d'études ont été faites spécifiquement sur les communautés fongiques de l'aulne dans de tels environnements. Cependant, l'absence quasi totale de champignons ectomycorhiziens, typiques des communautés fongiques de l'aulne, nécessiterait de plus amples recherches pour être adéquatement expliquée. Bien qu'aucun champignon isolé n'ait montré une tolérance élevée à tous les contaminants, les champignons appartenant à l'ordre des *Helotiales* ont généralement montré une résistance plus élevée aux contaminants testés. Cette résistance transversale est probablement due à un mécanisme de résistance non spécifique telle la constitution de la paroi. La stimulation de la croissance des champignons en présence de faibles niveaux d'arsenic a été répertoriée dans la littérature. Cependant, aucune étude ne permet d'expliquer clairement les causes de cet effet. Finalement, les essais de croissance, en raison de leur nombre limité, ne permettent pas de tirer de conclusions générales sur les

relations plantes-endophytes. Par contre, elles ouvrent la voie à une distinction entre les effets sur la croissance dus à leur présence et à celle de contaminants.

Ces caractérisations se veulent une première étape permettant de sélectionner certains endophytes fongiques montrant un potentiel intéressant pour le développement de solutions de phytostabilisation des métaux.

Mots clés : Aulne, phytostabilisation, métaux, endophyte, champignon.

REMERCIEMENTS

J'aimerais tout d'abord remercier ma directrice de recherche, la professeure Carole Beaulieu, de même que mon co-directeur de recherche, le professeur Sébastien Roy, pour m'avoir accueilli au sein de leurs équipes. Je souhaite également remercier mes conseillers de maîtrise, les professeurs Robert Bradley et Pascale Beauregard, pour leurs critiques et commentaires constructifs.

Je tiens également à remercier les assistants de recherche et mes collègues étudiants pour leur support. Finalement, je souhaite remercier le conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada (CRSNG) et le Fond québécois de la recherche sur la nature et les technologies (FQRNT) pour leur support financier.

TABLE DES MATIÈRES

CHAPITRE 1: INTRODUCTION	0
Les sols contaminés au Québec: types de contamination et limites réglementaires	0
Les éléments à l'étude et leur toxicité	3
Méthodes pour décontaminer des sols contenant des métaux et métalloïdes	6
La phytostabilisation.....	6
Avantages et inconvénients de la phytostabilisation.....	10
L'aulne comme candidat à la phytostabilisation de métaux ou de métalloïdes	10
Contribution des endophytes fongiques à la phytostabilisation	14
Sélection de souches résistantes et protection des plants hôtes	16
LES OBJECTIFS	20
CHAPITRE 2 : TROUVER LE BON PARTENAIRE : ISOLEMENT ET CARACTÉRISATION DE LA TOLÉRANCE AUX MÉTAUX D'ENDOPHYTES FONGIQUES CHEZ L'AULNE CRISPÉ ET L'AULNE RUGUEUX.	23
Référence de l'article et contribution des auteurs	23
Apport et originalité de l'article pour la science	23
Manuscrit de l'article	25
Abstract	25
Introduction.....	26
Materials and Methods	29
Root Sampling.....	29
Endophytic Fungi Isolation	30
Fungal strains and culture conditions.....	31
Fungal Identification	32
Validation of Endophytic Status.....	33
Metal/Metalloid and pH Tolerance	34
Results	36
Isolation, identification of fungal strains and validation of endophytic status	36
Validation of endophytic status.....	41
Copper, nickel, zinc, arsenic and acidic pH tolerance	43
Discussion	46

Acknowledgements	51
Bibliography	52
Appendix 1	63
CHAPITRE 3: ESSAIS DE CROISSANCE D'AULNES RUGUEUX ET CRISPÉS INOCULÉS.	67
Introduction	67
Matériel et méthode	68
Résultats	69
Discussion	70
CONCLUSION	72
BIBLIOGRAPHIE	76

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AC	<i>Alnus alnobetula</i> ssp. <i>crispa</i> ou aulne crispé
ADN	Acide désoxyribonucléique
AR	<i>Alnus incana</i> ssp. <i>rugosa</i> ou aulne rugeux
ANOVA	Analysis of variance
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
DNA	Deoxyribonucleic acid
DSE	Dark septate endophyte
ECM	Ectomycorhize ou Ectomycorrhiza
MDDEFP	Ministère du développement durable, de l'environnement, de la faune et des parcs
MDDELCC	Ministère du développement durable, de l'environnement et de la lutte aux changements climatiques
MM	Métaux et métalloïdes
MMN	Modified Melin-Norkrans Medium
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NTSC	National Tree Seed Centre of Canada
PCR	Polymerase Chain Reaction
tn	Tonne métrique
UAMH	University of Alberta Mold Herbarium

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1	Harvesting sites used for the collection of <i>Alnus incana</i> ssp. <i>rugosa</i> (AR) and <i>Alnus alnobetula</i> ssp. <i>crispa</i> (AC) roots.	p. 31
Tableau 2	Origin of potential mycorrhizal or DSE endophytes per host per site.	p. 38
Tableau 3	Nearest GenBank neighbours to the selected fungal strains.	p. 39

LISTE DES FIGURES

Figure 1	Neighbour joining analysis showing the position of strains based on ITS1-5.8S rDNA-ITS2 sequences using <i>Spyromyces spiralis</i> as an outgroup.	p. 41
Figure 2	Root colonization by various endophytes.	p. 43
Figure 3	Rank median per strain in media amended with metals (pH 4.3) or at pH 2 without metal.	p. 46
Figure 4	Rank median and interquartile range per strain, growth media amended with Cu^{2+} 150 ppm, pH 4.3	p. 64
Figure 5	Rank median and interquartile range per strain, growth media amended with Ni^{2+} 50 ppm, pH 4.3	p. 65
Figure 6	Rank median and interquartile range per strain, growth media amended with Zn^{2+} 225 ppm, pH 4.3	p. 66
Figure 7	Rank median and interquartile range per strain, growth media amended with As^{3+} 50 ppm, pH 4.3	p. 67
Figure 8	Rank median and interquartile range per strain, growth media amended with As^{3+} 150 ppm, pH 4.3	p. 68
Figure 9	Rank median and interquartile range per strain, growth media at pH 2	p. 69
Figure 10	Rang et écart interquartile par souche inoculée.	p. 71

CHAPITRE 1: INTRODUCTION

Les sols contaminés au Québec: types de contamination et limites réglementaires

Le Ministère du développement durable, de l'environnement, de la faune et des parcs (MDDEFP) considère comme contaminé tout sol dépassant le critère B, tel que défini à l'annexe 1 du règlement sur la protection et la réhabilitation des terrains (Gouvernement du Québec, 2017). Au-delà de ce critère, le responsable de la contamination doit prendre les mesures pour réhabiliter le terrain de façon à ce que les sols résiduels respectent les normes réglementaires (Gouvernement du Québec, 2017). Cependant,

« si un terrain a été soumis à une évaluation des risques toxicologiques et écotoxicologiques accompagnée d'une évaluation des impacts sur les eaux souterraines, en remplacement de la décontamination du terrain aux valeurs réglementaires, le niveau de la contamination résiduelle peut dans ce cas être supérieur aux valeurs réglementaires » (Hébert and Bernard, 2013).

Dans son « Bilan sur la gestion des sites contaminés au 31 décembre 2010 », le MDDEFP mettait à jour la situation des terrains contaminés au Québec (Hébert and Bernard, 2013). À cette date, le Québec comptait 8334 sites contaminés. Les superficies contaminées n'étaient connues que pour 44% des sites et représentaient près de 23 millions de mètres carrés. Quant aux volumes impliqués, ils représentaient près de 5 millions de mètres cubes pour 33% des sites. Le type de contamination des sites est varié et compte souvent plus d'un contaminant. Les

contaminants les plus répandus sont les hydrocarbures pétroliers (C₁₀ à C₅₀) étant présents sur 65% des sites. Les hydrocarbures aromatiques monocycliques (26%) et polycycliques (23%) constituent également une source importante de contamination. La contamination aux métaux et métalloïdes (MM) est quant à elle présente sur 26% des sites, les résidus provenant de l'industrie minière représentant une portion importante des sols contaminés aux MM au Québec. Les autres sources de contamination, tels les biphényles polychlorés, les acides, les bases, les pesticides et autres contaminants représentent des proportions beaucoup plus faibles. Deux problématiques sont également soulignées dans ce bilan, soit la migration de la contamination vers les nappes phréatiques et l'augmentation croissante des volumes de sols excavés et transportés vers des sites d'enfouissement. En effet, pour près de 25% des sites étudiés, les contaminants avaient atteint les eaux souterraines. Quant au volume des sols enfouis par des entreprises spécialisées, il est passé de 633 484 tm en 2001 à 807 299 tm en 2010.

Afin de faire face à ces problématiques, le Ministère du développement durable, de l'environnement et de la lutte aux changements climatiques (MDDELCC) a mis de l'avant sa politique de réhabilitation des sols et des terrains contaminés (Ministère du développement durable, 2017). Parmi les stratégies mises de l'avant, une vise à contrer la propagation de la contamination des sols et des eaux souterraines notamment par le développement de technologies vertes. Une autre stratégie vise la réduction de l'enfouissement des sols. Les deux principaux axes de développement identifiés pour adresser cette problématique sont le développement de solutions de valorisation des sols contaminés et le traitement *in situ*.

Les contaminants à base de carbone, dont notamment les hydrocarbures, peuvent être dégradés par des microorganismes, ce qui n'est pas le cas pour les MM (Bélanger, Bellenger and Roy, 2015). Considérant leur nature immuable, les MM

représentent aujourd'hui un des plus sérieux problèmes environnementaux (Dhankhar and Hooda, 2011), d'autant plus que les MM peuvent se propager dans la chaîne alimentaire et être bio accumulés, devenant une source de toxicité éventuelle pour les humains (Vandecasteele *et al.*, 2008; Barbafieri *et al.*, 2013). Considérant cette problématique particulière, cette étude ciblera donc la contamination aux MM.

Des seuils de toxicité universels sont difficiles à établir puisqu'ils varient significativement en fonction du contaminant, de sa forme chimique, des caractéristiques de l'organisme exposé (génétique, état de santé, âge, etc.), de la voie d'absorption et du temps et de la fréquence d'exposition (Tchounwou *et al.*, 2012). De plus, les seuils de toxicité chez les humains sont inférés d'accidents, d'événements de santé industrielle, d'empoisonnements accidentels, de tentatives de suicide ou d'expériences sur d'autres mammifères (Nordberg, Fowler and Nordberg, 2007). Au niveau biologique, les MM peuvent affecter les organelles, composantes cellulaires et certaines enzymes (Wang and Shi, 2001). Les MM peuvent également interagir avec l'ADN et certaines protéines cellulaires et causer des modifications au niveau des cycles cellulaires, l'apparition de cancers et l'apoptose (Beyersmann and Hartwig, 2008). Afin de circonscrire cette recherche, l'analyse sera limitée à quatre contaminants retrouvés sur des sites industriels en Abitibi-Témiscamingue et Nord-du-Québec, soit le cuivre, le nickel, le zinc et l'arsenic, et ayant des effets toxiques sur de nombreux organismes, dont les humains (Nordberg, Fowler and Nordberg, 2007). D'ailleurs, la teneur de ces métaux dans les sols est réglementée au Québec et ne doit pas dépasser par kilogramme de matière sèche : 50 mg pour l'arsenic, 500 mg pour le cuivre, 500 mg pour le nickel et 1500 mg pour le zinc (critère pour les sols d'usage industriel) (Beaulieu, 2016).

Les éléments à l'étude et leur toxicité

Le cuivre est un métal et un élément essentiel participant à de nombreuses fonctions biologiques, principalement en tant que composantes enzymatiques, telles que la respiration cellulaire (cytochromes c oxydases), la défense face aux antioxydants (superoxydes dismutases), la formation de tissus (lysyl-oxydases) et la biosynthèse de neurotransmetteurs (dopamines bêta hydroxylases) (WHO, 1998). Cependant, comme le cuivre est hautement réactif, sa forme ionique peut causer d'importants dommages au niveau cellulaire. Les niveaux de cuivre sont donc contrôlés via différents transporteurs membranaires, méthallothionéines et métallochaperones (Ellingsen, Horn and Aaseth, 2007). Les effets toxiques d'une surdose de cuivre chez l'humain par ingestion incluent l'hémolyse, le dysfonctionnement hépatique (dont des jaunisses), des saignements gastro-intestinaux et l'arrêt des fonctions rénales (Ahasan, Chowdhury and Azhar, 1994; Liu *et al.*, 2001; Mortazavi and Javid, 2009; Meena and Bansal, 2014). La respiration de poussières contenant du cuivre peut causer des inconforts, mais aucun cas de toxicité sévère n'a été rapporté à ce jour (Ellingsen, Horn and Aaseth, 2007).

Le nickel est un métal considéré comme essentiel chez les plantes (Brown, Welch and Cary, 1987) et plusieurs enzymes bactériennes contenant du nickel ont été identifiées (Klein and Costa, 2007). Cependant, le statut d'élément essentiel n'a pas été prouvé chez l'humain (Klein and Costa, 2007), bien qu'on retrouve du nickel à de faibles niveaux dans le sérum (0,05 à 0,1 µg/L) (WHO, 1991). Cependant, le nickel pourrait être essentiel pour les animaux à très faible dose, notamment au niveau de la régulation de l'absorption du fer par l'intestin (Latunde-Dada *et al.*, 2004), du contrôle de la croissance intra-utérine (Stangl and Kirchgessner, 1996) ou au niveau de l'activation du groupement hème de l'oxygénase (Sunderman *et al.*, 1983). Les

effets toxiques du nickel sont nombreux et varient en fonction de la voie de pénétration (Klein and Costa, 2007). Au niveau de la peau, le nickel est considéré comme la substance entraînant le plus grand nombre de réactions allergiques (Liden, Wahlberg and Maibach, 1995), touchant près de 30% de la population, et causant des réactions auto-immunes tels l'eczéma ou l'urticaire (Bataille, 2004). Le nickel nuit également au système reproducteur entraînant la déformation et la perte de motilité chez les spermatozoïdes (Yokoi, Uthus and Nielsen, 2003). L'inhalation de nickel peut entraîner des rhinites, sinusites et la perforation du septum nasal (Boysen *et al.*, 1982). Certaines formes de nickel, dont le tétracarbonyle de nickel ($\text{Ni}(\text{CO})_4$), sont extrêmement toxiques et peuvent causer la mort (Scott *et al.*, 2002). Cependant, ce sont les propriétés mutagènes et cancérigènes du nickel qui sont les plus dommageables au niveau de la santé humaine, le nickel étant classé parmi les composés les plus cancérigènes (International Agency for Research on Cancer, 1990). En effet, différents composés de nickel, dont divers sulfites et oxydes, peuvent pénétrer les cellules et causer des aberrations au niveau des chromosomes et des mutations au niveau de l'ADN, soit en interagissant directement avec ce dernier ou en induisant la production de dérivés réactifs de l'oxygène (Klein and Costa, 2007).

Le zinc est aussi un métal et un élément essentiel chez l'humain (Standstead and Au, 2007). Cependant, une ingestion trop importante de zinc peut prévenir l'absorption au niveau intestinal d'un autre élément essentiel, le cuivre (Sandstead, 1995). Ce risque, souvent sous-évalué, peut causer d'importants problèmes de santé, tel l'arythmie cardiaque, de haut taux de cholestérol LDL, l'anémie et différents types de malformations cellulaires (Standstead and Au, 2007). Le seul composé de zinc étant connu comme provoquant des réactions toxiques sévères est le chlorite de zinc, pouvant endommager le pancréas lorsqu'ingéré ou causer la mort par pneumonie chimique sévère, lorsque respiré (McKinney, Brent and Kulig, 1994; Mahboob, Richeson III and McCain, 2017). Les autres formes d'intoxication causent des

nausées, crampes et diarrhées lorsqu'ingéré et des fièvres, nausées et fatigues lorsqu'inhalé (Standstead and Au, 2007).

L'arsenic est un métalloïde qui n'a aucune fonction biologique connue et peut causer d'importants effets toxiques chez l'humain, l'arsenic étant utilisé comme un poison de choix depuis l'antiquité (Fowler *et al.*, 2007; Beyersmann and Hartwig, 2008). Lorsqu'absorbé, l'arsenic se diffuse rapidement à l'ensemble des cellules du corps et peut donc atteindre et causer d'importants dommages à différents systèmes tels le système gastro-intestinal, rénal, hépatique, hématologique, nerveux, ophtalmologique, respiratoire et cardiovasculaire (WHO, 2001; ATSDR, 2007). La toxicité de l'arsenic varie significativement en fonction de sa forme moléculaire, de la dose et de la durée d'exposition (Abernathy *et al.*, 1999). Sous sa forme As(III), l'arsenic peut se lier aux groupes thiols et sulfhydryles et inactiver plus de 200 enzymes, alors que sous sa forme pentavalente, As(V), elle peut se substituer au phosphate impliqué dans de nombreuses voies de signalisations. Ces effets génériques expliquent ses impacts sur de nombreux systèmes (Goyer, 2001; Hughes, 2002). La principale cause de dommage lié à l'arsenic est sa capacité à inhiber la respiration cellulaire par l'inactivation d'enzymes mitochondriales et le découplage de la phosphorylation oxydative, causant par le fait même la mort cellulaire (Fowler *et al.*, 2007; Tchounwou *et al.*, 2012). L'arsenic est également une substance cancérigène chez l'humain (Yoshida, Yamauchi and Fan Sun, 2004). Cependant, les mécanismes moléculaires impliqués sont encore peu connus, la formation de chromosomes anormaux, la présence de stress oxydatif et l'altération de facteurs de croissance, figurant parmi les mécanismes potentiels ayant donnés des résultats expérimentaux positifs (Tchounwou *et al.*, 2012).

Méthodes pour décontaminer des sols contenant des métaux et métalloïdes

L'enfouissement et le confinement des sols demeurent à ce jour les seules techniques utilisées au Québec pour effectuer la réhabilitation de sites contaminés avec des MM (Hébert and Bernard, 2013). Cependant, ces techniques nécessitent d'important travaux d'excavation et de transport et entraînent des coûts importants (Miller and Miller, 2007; Hébert and Bernard, 2013). De plus, dans certaines circonstances, l'excavation des sols contaminés peut être difficilement réalisable. En effet, cela pourrait augmenter la bioaccessibilité des MM excavés s'ils sont peu mobiles ou être difficilement envisageable en raison de la poursuite d'activité engendrant des MM (Bolan *et al.*, 2011; Pourrut *et al.*, 2011; Barbafieri *et al.*, 2013; Hébert and Bernard, 2013). Ainsi, dans ces circonstances, l'utilisation de techniques de réhabilitation n'impliquant pas le retrait des sols contaminés aux MM pourrait être souhaitable.

La phytostabilisation

La phytostabilisation vise à réduire la mobilité de contaminants dans la zone vadose (zone du sol non saturée en eau) par la mise en place d'un couvert végétal, soit via l'absorption par les racines, l'adsorption à leur surface ou leur précipitation dans la rhizosphère, limitant ainsi leur propagation (Bolan *et al.*, 2011). Ainsi, contrairement à d'autres méthodes de décontamination, la phytostabilisation ne vise pas le retrait des sols contenant des contaminants d'un site, mais vise plutôt à diminuer la bioaccessibilité des contaminants dans le sol.

Un contaminant biodisponible peut être défini comme étant immédiatement disponible pour traverser la membrane cellulaire d'un organisme à partir du milieu dans lequel il vit (Semple *et al.*, 2004). Un contaminant bioaccessible a le potentiel de traverser la membrane cellulaire d'un organisme mais ne peut y parvenir en raison de conditions particulières (forme chimique du contaminant, pH du sol, etc.). Ce contaminant n'est donc pas biodisponible immédiatement et ne le deviendra que si les conditions qui empêchent le contaminant de pénétrer l'organisme changent (Semple *et al.*, 2004). Cette notion de réduction de la bioaccessibilité est centrale au concept de phytostabilisation et repose sur le principe que la quantité totale de contaminants dans un sol ne donne aucune indication sur les risques liés à de tels contaminants, tant au niveau de la toxicité, des risques de lixiviation ou de propagation dans la chaîne alimentaire via l'absorption par les plantes (Barbafieri, 2000).

Bien que le concept de phytostabilisation soit applicable à de nombreux contaminants, tant organiques qu'inorganiques, cette approche est particulièrement utile pour la gestion des MM (Barbafieri *et al.*, 2013). En effet, si l'activité microbienne peut mener à la dégradation de contaminants organiques, les MM ne le sont pas et leur temps de rétention dans les sols est difficile à établir (Ledin, 2000; Khan *et al.*, 2009). C'est donc sous l'aspect des MM que le sujet de la phytostabilisation sera abordé.

Dans leur revue, Bolan *et al.* (2011) identifient six mécanismes affectant l'efficacité d'une stratégie de phytostabilisation. Le premier consiste en la capacité des racines à extraire et séquestrer les MM de la portion soluble du sol (biodisponible) afin de prévenir leur distribution dans l'environnement (Wong, 2003). Le transfert vers les racines peut se faire par diffusion passive ou par divers processus actifs (Huang, 2004). La faible spécificité de certains mécanismes, comme c'est le cas de nombreux sidérophores, peut également entraîner une concentration supérieure de

MM dans les racines par rapport à celle de la solution du sol (hyperaccumulation) (Reid and Hayes, 2003). Ainsi, le retrait des MM biodisponibles de la solution du sol permet de diminuer la toxicité globale des MM présents dans le sol, les MM restants étant moins bioaccessibles (Bolan *et al.*, 2011). Cependant, si la translocation des contaminants dans la plante se fait vers les parties aériennes, ceux-ci peuvent être dispersés dans la chaîne alimentaire via la consommation par les herbivores et la chute des feuilles, rendant à nouveau les contaminants biodisponibles (Mertens *et al.*, 2004; Vandecasteele *et al.*, 2008). Ainsi, l'élaboration d'une stratégie de phytostabilisation doit tenir compte du lieu de stockage des MM par la plante.

Le deuxième mécanisme, soit celui de l'évapotranspiration, est lié de près à l'efficacité des plantes à absorber les MM présents dans la solution du sol. Les plantes consomment de vastes quantités d'eau, qu'elles extraient du sol via leur système racinaire (Raven, Evert and Eichhorn, 2000). Ce processus limite la migration de l'eau dans le sol et par conséquent le transport de MM dissous vers la nappe phréatique ou l'écosystème (Clothier *et al.*, 2008).

Le troisième mécanisme proposé par Bolan *et al.* (2011) concerne la modification des caractéristiques du sol pour limiter la bioaccessibilité des MM. Parmi ces caractéristiques, le pH joue un rôle prépondérant, agissant sur l'ensemble des processus biochimiques des sols. Il impacte directement la sorption et la précipitation des MM. La majorité des ions MM ayant une charge positive, leur bioaccessibilité est généralement réduite par une augmentation du pH. Cette réduction de la bioaccessibilité peut être causée par la précipitation des métaux sous forme d'hydroxydes ou la fixation des MM aux particules du sol (Bolan *et al.*, 2003). Cette affinité accrue est due à l'augmentation de la capacité d'échange cationique (CEC) des particules du sol (soit le nombre de charges négatives disponibles à leur surface) (Brady and Weil, 2008). Ainsi, de nombreux gestionnaires en environnement utilisent

des amendements basiques, tels la chaux ou des composés contenant du phosphate, pour réduire la bioaccessibilité des métaux (Bolan *et al.*, 2003).

Le quatrième mécanisme consiste en l'augmentation de la quantité de matière organique dans le sol. La matière organique du sol comprend à la fois la fraction vivante, constituée principalement des racines des plantes et des microorganismes, et la fraction non-vivante, constituée principalement des résidus végétaux et des composés organiques relâchés dans le sol par les plantes (exsudats racinaires) et les microorganismes (Brady and Weil, 2008). La matière organique peut, de par sa capacité à former des complexes stables avec les MM, diminuer leur bioaccessibilité (Hetrick, Wilson and Figge, 1994), les cations métalliques ayant notamment une grande affinité pour les groupements fonctionnels des acides organiques (Zaccone *et al.*, 2009). La production d'exsudats racinaires par les plantes peut cependant avoir d'autres impacts sur les caractéristiques du sol, dont la réduction du pH via la production d'acides organiques, ce qui peut augmenter le nombre d'ions MM en solution (Yang *et al.*, 2005).

Les deux derniers mécanismes concernent la mise en place de barrières physiques. La mise en place d'un couvert végétal diminue considérablement l'érosion éolienne et hydrique et donc la migration des MM dans l'environnement (Bolan *et al.*, 2011). Finalement, un couvert végétal limite le contact des humains et des animaux avec les MM présents dans le sol (Bolan *et al.*, 2011).

Avantages et inconvénients de la phytostabilisation

Le principal avantage de la phytostabilisation est son faible coût relativement à d'autres méthodes de gestion des contaminants (Miller and Miller, 2007). Par contre, les contaminants demeurant sur place, un suivi des sites contaminés est nécessaire puisqu'il y a le risque que ces conditions environnementales changent et que les contaminants redeviennent biodisponibles, et ce, à perpétuité (Barbafieri *et al.*, 2013).

L'aulne comme candidat à la phytostabilisation de métaux ou de métalloïdes

Les aulnes sont des arbres et arbustes du genre *Alnus* de la famille des bétulacées et comportent 34 espèces distribuées à travers le monde, surtout dans les habitats froids et tempérés de l'hémisphère nord (Schwintzer and Tjepkema, 1990; Roy, Khasa and Greer, 2007). Il s'agit du seul genre de cette famille à avoir développé une symbiose avec une actinobactérie fixatrice d'azote, *Frankia* spp. (Chen and Li, 2004). Le Québec compte trois espèces indigènes d'aulnes, *Alnus alnobetula* ssp. *crispa* (aulne crispé), *Alnus incana* ssp. *rugosa* (aulne rugueux) et *Alnus serrulata* (aulne tendre ou aulne blanc), ce dernier étant cependant rare et retrouvé seulement en bordure du Saint-Laurent (Brouillet *et al.*, 2010; Ressources naturelles Canada, 2015). Les aulnes sont reconnus comme plantes pionnières dans des environnements stressants tels des tills glaciaires, des dépôts de gravier, des dunes et des sols volcaniques (Wall, 2000; Schwencke and Carú, 2001; Dawson, 2008). Cette capacité de croissance en milieu pauvre est un atout de l'aulne dans une perspective de phytostabilisation puisque la colonisation végétale de sites

contaminés peut être limitée non seulement par la présence souvent toxique de contaminants, mais également par le manque de macronutriments (Lorenc-Plucińska, Walentyńowicz and Niewiadomska, 2013).

À ce titre, les aulnes peuvent être considérés comme des candidats pour la phytostabilisation puisqu'ils sont moins affectés par ce type de carences, les aulnes entretenant une relation symbiotique avec l'actinobactérie fixatrice d'azote *Frankia* spp. (Roy, Khasa and Greer, 2007). L'association avec *Frankia* spp. permet à l'aulne d'accéder à l'azote atmosphérique (N₂) (Diem, 1996; Bhatti *et al.*, 1998) et peut fournir entre 70% et 100% de l'azote nécessaire à la plante (Hurd, Raynal and Schwintzer, 2001; Myrold and Huss-Danell, 2003). Les avantages de cette symbiose peuvent être considérés comme faisant partie des caractéristiques de l'aulne puisqu'aucun aulne n'a été trouvé à ce jour sans son symbiote actinobactérien dans l'environnement (Chaia, Wall and Huss-Danell, 2010). Finalement, Bélanger *et al.* (2015) ont effectué des essais en conditions hydroponiques où des plantules d'aulnes ont été inoculées avec *Frankia alni* (ACN14a) en présence de métaux lourds (cuivre, nickel, zinc, plomb et cadmium). Ces essais ont montré que l'association aulne-*Frankia alni* peut se réaliser en présence de métaux et que les aulnes inoculés affichent des taux de croissance supérieurs à ceux non inoculés, et ce, malgré la présence de métaux.

L'aulne est également en mesure de former un autre type de symbiose, soit la symbiose mycorhizienne, avec plusieurs espèces de champignons. L'association avec divers champignons mycorhiziens facilite l'acquisition de nombreux nutriments chez l'aulne, mais particulièrement du phosphore (Walker *et al.*, 2014). Les endomycorhizes, surtout présentes chez l'aulne à des stades juvéniles (Molina, Myrold and Li, 1994; Polme *et al.*, 2013), se sont spécialisés au cours de leur évolution vers l'acquisition de phosphore qu'elles transfèrent en partie à leur plante

hôte (Garbaye, 2013). Les ectomycorhizes présentes chez les aulnes permettent l'acquisition de divers éléments nutritifs, mais ont également développé une spécialisation vers l'acquisition de phosphore (Walker *et al.*, 2014). L'association mycorhizienne peut ainsi contribuer à la haute demande de phosphore causée par la fixation de l'azote, le manque de phosphate pouvant affecter négativement la nodulation (Roy, Khasa and Greer, 2007). Finalement, le réseau mycélien peut être vu comme une extension du réseau racinaire et favoriser l'absorption d'eau, augmentant ainsi sa tolérance au stress hydrique (Monzón and Azcón, 2001).

Finalement, il a récemment été rapporté que les aulnes forment un troisième type d'association de type pseudomycorhize (Xu *et al.*, 2015). Les champignons pseudomycorhiziens sont un groupe hétérogène de champignons ascomycètes conidiens ou stériles (Jumpponen and Trappe, 1998). Leur nom anglais « *Dark septate endophytes* » provient de leurs hyphes septés dont la paroi cellulaire contient d'importantes quantités de mélanine leur donnant une couleur brun foncé (Jumpponen, 2001). Contrairement aux autres types de mycorhizes, ces champignons ne semblent pas former de structures permettant l'échange de nutriments au niveau cellulaire (Newsham, 2011). Ces champignons forment des associations avec de nombreuses plantes (mycorhiziennes ou non) et peuvent être retrouvés des tropiques aux habitats subarctiques (Jumpponen and Trappe, 1998). Ils semblent posséder un important niveau de tolérance aux métaux, étant un des types de champignons dominant sur les sites contaminés aux MM (Likar and Regvar, 2009; Regvar *et al.*, 2010; Zhang, Li and Zhao, 2013). La nature de la relation entre ces champignons et leur hôte, variant du mutualisme au parasitisme, a été l'objet de plusieurs études (Newsham, 2011; Mayerhofer, Kernaghan and Harper, 2013). La combinaison champignon-plante et les conditions environnementales semblent être des facteurs clés déterminant la nature de la relation (Mandyam and Jumpponen, 2005; Newsham, 2011; Mayerhofer, Kernaghan and Harper, 2013). Cependant, la dégradation de molécules organiques complexes par ces champignons et leur

capacité à solubiliser le phosphore inorganique, permettant d'augmenter la quantité d'éléments nutritifs dans la rhizosphère (Jumpponen and Trappe, 1998; Upson, Read and Newsham, 2009; Mandyam, Loughin and Jumpponen, 2010; Monica *et al.*, 2015), pourrait favoriser l'établissement de leur plantes hôtes sur des sites pauvres en nutriments. Finalement, certaines études ont montré que la présence de champignons pseudomycorhiziens peut augmenter la résistance de plantes aux MM en limitant leur absorption (Li *et al.*, 2011; Affholder *et al.*, 2014).

Au-delà de leur capacité à s'implanter sur des sites contaminés aux MM (Dickinson, 2000; Markham, 2005; Vandecasteele *et al.*, 2008; Kuznetsova *et al.*, 2010, 2011; Pourrut *et al.*, 2011; Babu, Kim and Oh, 2013), les aulnes ont également plusieurs caractéristiques intrinsèques qui en font des candidats intéressants à des fins de phytostabilisation. Premièrement, les aulnes utilisent une grande quantité d'eau, principalement parce que leurs feuilles n'ont aucun mécanisme permettant de contrôler leur transpiration (Claessens *et al.*, 2010). Ainsi, l'eau consommée et transpirée peut égaler les précipitations annuelles dans certaines circonstances, amenant la migration de l'eau dans le sol à des niveaux pratiquement nuls (Herbst, Eschenbach and Kappen, 1999). Comme mentionné précédemment, cette caractéristique permet de limiter la migration des contaminants vers les nappes phréatiques et l'environnement en limitant la pénétration de l'eau dans le sol et retirant les contaminants de la solution du sol. Une deuxième caractéristique est la contribution des aulnes à l'établissement d'autres espèces végétales, les aulnes agissant souvent à titre de précurseurs (Lorenc-Plucińska, Walentynowicz and Niewiadomska, 2013). Les aulnes ont un faible taux de translocation de l'azote des feuilles âgées vers le tronc (Kuznetsova *et al.*, 2010). Cette perte d'azote via la chute des feuilles correspond à environ 45% de l'azote fixé par les plants et contribue ainsi directement à l'enrichissement du sol en azote organique lors de la perte des feuilles (Huss-Danell, 1997). L'accroissement de la production végétale permet par le fait

même d'augmenter la matière organique dans le sol et ainsi diminuer la bioaccessibilité des MM.

La distribution des MM dans la plante est importante afin d'éviter la migration des contaminants dans la chaîne alimentaire ou l'environnement. À ce titre, lors d'essais de croissance d'aulnes (*Alnus incana* et *Alnus glutinosa*) en sol contaminé, Lorenc-Plucińska et al. (2013) ont montré une accumulation de cuivre et un entreposage de zinc, cadmium et plomb au niveau des racines, mais un faible transfert au niveau de la tige. Quant aux taux de métaux des feuilles, ceux-ci se comparaient, chez *Alnus glutinosa*, à ceux rencontrés en milieux considérés non contaminés. Une autre étude effectuée par Bélanger et al. (2011) a montré des résultats similaires pour l'arsenic et le vanadium où ces contaminants se retrouvaient accumulés au niveau des racines, le sélénium affichant par contre une tendance inverse. Finalement, les aulnes sont connus pour accumuler le nickel au niveau de leurs racines et nodules, le nickel étant essentiel à la synthèse d'hydrogénases responsables de l'oxydation de l'hydrogène survenant lors de la fixation de l'azote atmosphérique par *Frankia* sp. (Bélanger, Bellenger and Roy, 2015). La connaissance de la migration des métaux chez l'aulne est incomplète et nécessite des recherches impliquant d'autres MM, mais aussi tenant compte de l'interaction potentielle des MM entre eux. Ce manque de connaissances a orienté le choix des MM ici à l'étude, le choix portant uniquement sur des MM dont la migration vers les parties aériennes de l'aulne est limitée.

Contribution des endophytes fongiques à la phytostabilisation

La contribution des endophytes fongiques à la phytostabilisation va au-delà de la contribution à la survie de la plante et son acquisition de nutriment. Comme mentionné précédemment, l'augmentation du taux de matière organique dans le sol constitue un des principaux mécanismes pour réduire la bioaccessibilité des MM. À ce titre, les endophytes fongiques peuvent jouer un rôle important dans la fixation des métaux dans le sol et dans la réduction de leur bioaccessibilité à l'aide de leurs propres mécanismes de tolérance aux MM.

Un des mécanismes extracellulaires de tolérance des champignons consiste en la production et la sécrétion de composés organiques dont plusieurs acides di- ou tri-carboxyliques permettant la chélation d'ions métalliques, réduisant ainsi leur bioaccessibilité (Bellion *et al.*, 2006). À titre d'exemple, les citrates peuvent former des complexes avec l'aluminium (Landeweert *et al.*, 2001). La production de protéines extracellulaire, telle la glomaline produite par les glomérormycètes, peut également réduire la bioaccessibilité de certains ions métalliques, la glomaline pouvant entre autres séquestrer efficacement le cuivre, le plomb et le cadmium (Carrillo-Gonzalez *et al.*, 2004).

Les hyphes fongiques peuvent pénétrer le sol de façon plus prononcée que les racines des plantes et ont un important ratio surface-volume augmentant ainsi le volume de sol en contact avec de la matière organique (Corrêa and Martins-Louçao, 2011). Plus particulièrement, le contact étendu du sol avec la paroi fongique, pouvant représenter jusqu'à 30% de la masse sèche des champignons, permet la sorption d'une quantité importante de MM (Blaudez, Botton and Chalot, 2000; Dhankhar and Hooda, 2011). En effet, les polymères de chitine, glucane et galactosamine de la paroi cellulaire des champignons ont de nombreux groupements carboxyle, aminés, hydroxyle, sulfate et phosphates permettant la sorption d'ions métalliques (Stradberg, Shumate and Parrott, 1981; Dhankhar and Hooda, 2011). La

composition chimique de la paroi fongique en fait un lieu de fixation des MM plus efficace que les parois des cellules racinaires végétales et a la capacité d'accumuler une plus grande quantité de MM (Turnau, Kottke and Dexheimer, 1996; Turnau, Przybylowicz and Mesjasz-Przybylowicz, 2001; Turnau *et al.*, 2002).

Les champignons peuvent également entreposer des MM au niveau intracellulaire par la chélation des ions dans le cytoplasme à l'aide de diverses molécules (Luo *et al.*, 2014). Parmi celles-ci, les métallothionéines, protéines de faibles poids moléculaires, ont une grande affinité pour les MM en raison des groupements thiols situés sur les cystéines dont elles sont riches (Bellion *et al.*, 2006). La glutathione et ses dérivés les polychélatines, permettent également la capture des ions MM à l'aide des groupements thiol des cystéines (Helbig *et al.*, 2008). Ces complexes lorsque présent à de trop fortes concentrations dans le cytoplasme peuvent être transportés vers la vacuole pour y être entreposé (González-Guerrero *et al.*, 2016).

Finalement, les champignons ectomycorhiziens (ECM) peuvent s'accaparer une portion importante des photosynthétats produits par la plante (Wu, Nara and Hogetsu, 2002) et favoriser l'allocation de carbone aux racines (Corrêa and Martins-Louçao, 2011) augmentant ainsi la quantité totale de matière organique produite dans le sol.

Sélection de souches résistantes et protection des plants hôtes

Dans leur revue, Hartley *et al.* (1997) concluaient que malgré une importante variabilité dans leur tolérance face aux MM, les arbres affichaient des tolérances

maximales habituellement inférieures à celle des microorganismes en général et des ECM en particulier (Hartley, Cairney and Meharg, 1997). Plusieurs études des communautés ECM sur des sols serpentins (Urban *et al.*, 2008; Moser *et al.*, 2009) et anthropophisés (Blaudez *et al.*, 2000; Krpata *et al.*, 2008) ont montré une grande diversité au sein des communautés ECM en mesure de coloniser les arbres sans identifier un taxon affichant une tolérance particulière aux MM. Ces observations ont supporté l'hypothèse que les ECM possédaient un niveau constitutif de tolérance assez élevé pour qu'il n'y ait que peu de pression sélective menant au développement de taxa résistants (Blaudez *et al.*, 2000).

Cependant, d'autres études montrent des changements importants au niveau de la communauté ECM dans des environnements extrêmes et même la disparition complète des ECM basidiomycètes au profit de pseudomycorhizes ascomycètes (Colpaert, 2008; Likar and Regvar, 2009; Ruotsalainen, Markkola and Kozlov, 2009), suggérant qu'une pression sélective peut mener au développement de souches plus tolérantes. Ceci a mené plusieurs auteurs à proposer que certaines souches fongiques ont évolué et acquis des mécanismes de tolérances à des MM spécifiques (Egertonwarburton and Griffin, 1995; Colpaert *et al.*, 2004; Jourand *et al.*, 2010). Dans son article de 2011, Colpaert *et al.*, montre que le développement de la tolérance à des niveaux de toxicité élevés passe par le rejet des ions MM du cytoplasme vers l'apoplasme, les autres mécanismes de tolérance, telle la sorption par les parois ou la chélation des ions, pouvant être saturés ou surchargés à haute concentration (Colpaert *et al.*, 2011).

Chez les champignons, plusieurs transporteurs membranaires peuvent réguler l'entrée des MM dans le cytoplasme, tels les ZIP et les Nramp. Chaque ion essentiel est habituellement associé à deux transporteurs spécifiques ou plus, l'un à forte affinité permettant l'entrée lorsque présents à faibles concentrations et l'autre à faible

affinité lorsque l'ion est présent à forte concentration (Guerinot, 2000; Nevo and Nelson, 2006). D'autres transporteurs permettent le retrait d'ions en excès du cytoplasme, et ce, pour les ions essentiels comme pour les ions ne participant à aucune fonction biologique (Luo *et al.*, 2014). À titre d'exemple, les pompes de type P_{1B} -ATPases dédiées à certains ions essentiels jouent un rôle central dans l'homéostasie de ces métaux lorsqu'ils sont en surplus, mais également dans celle d'autres ions toxiques (Argüello, Eren and González-Guerrero, 2007). En effet, la similarité chimique entre certains ions toxiques et ions essentiels leur permet l'accès à ces pompes. Ainsi, les pompes de type Zn^{2+} -ATPases permettent le retrait d'ions Cd^{2+} et Pb^{2+} du cytoplasme vers l'apoplasme (Argüello, Eren and González-Guerrero, 2007). La présence de ces pompes et leur quantité sont le mécanisme clé permettant l'apparition de véritables souches résistantes à certains MM spécifiques (Colpaert *et al.*, 2011).

Le rejet vers l'apoplasme empêcherait le transfert d'ions MM vers la plante hôte et permettrait une véritable protection de cette dernière par le champignon. Ce mécanisme aurait également un sens d'un point de vue co-évolutif, l'activation des pompes membranaires, telles les pompes P_{1B} -ATPases, représentant un coût énergétique (Urban *et al.*, 2008) pouvant être supporté par la fourniture de sucres par la plante hôte. L'acquisition d'une tolérance élevée par le rejet d'ions vers l'apoplasme serait également cohérente avec diverses études où aucun champignon multi résistant aux MM n'a été observé (Blaudez *et al.*, 2000; Bellion *et al.*, 2006; Colpaert *et al.*, 2011), la présence de transporteurs spécifiques à un, ou quelques, MM particuliers, n'octroyant pas une tolérance à tous les MM tel que précédemment mentionné.

Les endophytes fongiques montrent des niveaux de tolérances aux métaux très variables, et ce tant au niveau intraspécifique qu'extraspécifique (Hartley, Cairney

and Meharg, 1997; Blaudez *et al.*, 2000). Il est donc possible que cette variabilité de tolérance au niveau de la souche fongique explique la variabilité dans les résultats observés dans la protection de l'hôte par des endophytes fongiques. Dans leur revue de 1998, Godbold *et al.* concluaient que la protection des hôtes par les ECMs n'était pas universelle et dépendait des souches ECMs et des métaux testés (Godbold *et al.*, 1998). Cette conclusion est appuyée par des études subséquentes qui montrent que certains endophytes fongiques peuvent efficacement protéger leurs hôtes du stress causé par certains MM spécifiques (Adriaensen *et al.*, 2004, 2005; Adriaensen, Vangronsveld and Colpaert, 2006; Krznaric *et al.*, 2009; Likar and Regvar, 2013; Berthelot, Blaudez and Leyval, 2017).

LES OBJECTIFS

Objectif 1: Prélever, isoler et identifier des endophytes fongiques de l'aulne crispé et rugueux provenant de milieux contaminés aux MM ou perturbés et valider leur statut d'endophytes.

Hypothèse 1 : Les endophytes fongiques ayant les niveaux de tolérance les plus élevés proviendront de sites contaminés aux MM.

Comme précédemment mentionné, les endophytes fongiques peuvent contribuer à augmenter la survie des plants et stabiliser les MM dans les sols, mais certaines souches semblent posséder des niveaux de tolérance supérieurs aux MM.

L'isolement et l'identification de certaines de ces souches seraient une première étape pour l'établissement de plants sur des sols hautement contaminés aux MM.

Les aulnes semblent un candidat de choix pour la phytostabilisation des sols contaminés. L'isolement et l'identification des endophytes fongiques de deux espèces d'aulnes retrouvés au Québec soit, l'aulne rugueux et l'aulne crispé, seront donc visés.

Comme l'acquisition de mécanismes de tolérance à des teneurs élevées de MM serait issue d'un processus évolutif récents, l'apparition de milieux hautement contaminés étant principalement due aux activités humaines (Colpaert *et al.*, 2011), une partie de la récolte se fera sur des sites contaminés aux MM, soit des sites miniers. Une autre partie de la récolte sera faite sur des sites perturbés non

contaminés. Cette approche a été choisie afin d'augmenter la diversité des souches isolées et à offrir une base de comparaison afin d'identifier les souches ayant des niveaux de tolérance plus élevés. Plusieurs endophytes fongiques pouvant vivre en tant que saprophyte dans le sol, les souches identifiées comme endophytes serviront à inoculer des plants d'aulnes rugueux ou crispés afin de remplir les postulats de Koch. Le travail comporte trois objectifs et hypothèses s'y rapportant.

Objectif 2: Mesurer la tolérance relative des isolats au cuivre, au nickel, au zinc et à l'arsenic.

Hypothèse 2: Les souches auront des mécanismes de tolérance différents et donc des tolérances différentes.

La tolérance des souches isolées au cuivre, au nickel, au zinc et à l'arsenic sera évaluée. En plus de la tolérance individuelle des souches, les niveaux de tolérance relatifs des souches entre elles seront mesurés afin d'établir lesquelles auraient un potentiel de survie plus élevé en milieu contaminé.

Objectif 3 : Mesurer la croissance d'aulnes inoculés par rapport à des aulnes non inoculés en présence de matière organique.

Hypothèses 3 : Les aulnes inoculés auront des taux de croissance supérieurs aux aulnes non inoculés.

Le rôle écologique de certains endophytes fongiques, notamment celui des pseudomycorhizes, demeure incertain. Ces champignons semblent avoir un impact plus important sur la croissance de leur plant hôte en présence de matière organique (Newsham, 2011). Afin de caractériser la relation entre les souches isolées et leurs hôtes, des essais de croissance seront effectués en milieu non défini contenant de la matière organique.

CHAPITRE 2 : TROUVER LE BON PARTENAIRE : ISOLEMENT ET CARACTÉRISATION DE LA TOLÉRANCE AUX MÉTAUX D'ENDOPHYTES FONGIQUES CHEZ L'AULNE CRISPÉ ET L'AULNE RUGUEUX.

Référence de l'article et contribution des auteurs

Steve Lalancette, Sébastien Roy et Carole Beaulieu sont les auteurs de l'article «*Finding the Right Partner: Isolating and Characterizing *Alnus incana* sbsp. *rugosa* and *Alnus alnobetula* sbsp. *crispa*'s Fungal Endophyte's Metal Tolerance* ». Les travaux en laboratoire, le développement et l'adaptation des techniques, l'ensemble de l'analyse et la rédaction de l'article ont été effectués par Steve Lalancette. Sébastien Roy et Carole Beaulieu ont supervisé les travaux et participé à la révision de l'article.

Apport et originalité de l'article pour la science

Cet article se veut un apport pour la science de trois aspects des connaissances actuelles de la communauté des endophytes fongiques du genre *Alnus* spp., soit ceux de la diversité, de la tolérance aux métaux des endophytes fongiques de l'aulne et de la caractérisation de la relation plante-endophyte.

Plusieurs études ont été menées sur la caractérisation de la communauté ECM de l'aulne (Molina, 1981; Godbout and Fortin, 1983; Molina, Massicotte and Trappe,

1992; Helm, Allen and Trappe, 1996; Tedersoo *et al.*, 2009; Kennedy and Hill, 2010; Roy *et al.*, 2013). Cependant, à notre connaissance, seulement une étude a étudié et caractérisé une autre partie de la communauté des endophytes fongique de l'aulne, soit celle des pseudomycorhizes (Xu *et al.*, 2015). Notre étude a permis de confirmer certains résultats de l'étude de Xu et al. (2015) et d'identifier des membres des genres *Cryptosporiopsis* spp. et *Rhizoscyphus* spp., à notre connaissance, comme endophytes de l'aulne pour la première fois.

Bien que la caractérisation de la tolérance aux métaux de divers endophytes fongiques ait été effectuée à maintes reprises (Blaudez *et al.*, 2000; Ban *et al.*, 2012; Berthelot *et al.*, 2016), seule l'étude de Xu et al. (2015) procède à la caractérisation d'endophytes isolés à partir d'aulnes (*Alnus nepalensis*) et ce par rapport au cadmium (Cd^{2+}) seulement. Notre article procède donc à la caractérisation d'autres taxons d'endophytes, certains n'ayant jamais été caractérisés, et ce par rapport à d'autres MM soit le cuivre (Cu^{2+}), le nickel (Ni^{2+}), le zinc (Zn^{2+}) et l'arsenic (As^{3+}).

Finalement, la nature de la relation entre les plantes et les pseudomycorhizes a été l'objet de nombreuses études dont les résultats ont été repris par deux méta-analyses (Newsham, 2011; Mayerhofer, Kernaghan and Harper, 2013) dont les résultats n'abondent pas dans le même sens. Comme il est impossible de définir clairement à priori la nature de la relation entre l'aulne et les pseudomycorhize, cette étude entreprend cette caractérisation avec les souches que nous avons.

Title: Finding the Right Partner: Isolating and Characterizing the Fungal Endophytes of *Alnus incana* subsp. *rugosa* and *Alnus alnobetula* subsp. *crispa*'s.

Authors: Lalancette, Steve, Roy, Sébastien and Beaulieu, Carole

Abstract

Soil contamination by metals is of particular interest, given that their retention times within the profile can be indefinite. Thus, phytostabilisation can be viewed as a means of limiting metal toxicity in soils. Due to their ability to grow on contaminated soils, alders have repeatedly been suggested as key species in phytostabilisation efforts. Alder's ability to grow on contaminated sites stems, in part, from its association with microbial endophytes; we characterised the biodiversity of fungal endophytes in *Alnus incana* ssp. *rugosa* and *A. alnobetula* ssp. *crispa* (= *A. viridis* ssp. *crispa*). Fungal endophytes were isolated from plants that were growing on or near disturbed environments; their tolerances to metals and low pH were subsequently assessed. A pot trial was also conducted with alder in uncontaminated organic soil. We identified *Cryptosporiopsis* spp. and *Rhizoscyphus* spp. as fungal endophytes of *Alnus* for the first time. Although no fungal strain showed high tolerance to a wide array of metals, detailed characterisations of strain tolerance to Cu, Ni, Zn and As, and acidic pH (4.3, 3 and 2) were performed.

Introduction

In a review, previously made a case that alders could be key species in rehabilitating habitats that have been destroyed or which have been adversely affected by human activities, based upon their ability to grow on contaminated sites and those sites containing low levels of nutrients (Roy *et al.* 2007). The presence of alders on these sites could indeed stimulate the biodegradation of organic contaminants while stabilising inorganic contaminants within soils. In addition, reduced migration of inorganic contaminants through phytostabilisation is seen as a promising practice since inorganic contaminants are not degraded and their retention times in soil are difficult to establish (Ledin 2000; Khan *et al.* 2009). Although they are not considered to be hyper-accumulators, alders have a demonstrated ability to limit metal migration in soils (Pourrut *et al.* 2011; Lorenc-Plucińska *et al.* 2013).

Alders include 34 species worldwide. They are perennial trees and shrubs of the genus *Alnus* in the Family Betulaceae that grow primarily in north temperate ecosystems (Roy *et al.* 2007). Alders are early successional species (Hibbs & Cromack 1990) that can grow in harsh environments (Bissonnette *et al.* 2014). They are less affected by nitrogen (N) and phosphorus (P) deficiencies in the soil than are other species (Lorenc-Plucińska *et al.* 2013), for several reasons. First, as actinorhizal species, alders are able to access atmospheric nitrogen through the activity of their bacterial partners, *i.e.*, *Frankia* spp. (Diem 1996; Bhatti *et al.* 1998). This capability allows them to act as nurse trees for other non-N₂-fixing species. Since alder leaves retain nitrogen during litter fall, they exhibit low levels of N translocation back to the stem (*e.g.*, Dawson & Funk 1981). This contributes to increased soil nitrogen levels (Kuznetsova *et al.* 2011). Second, alders are important to improving not only the status of inorganic-N in the soil, but the availability of phosphorus as well (*e.g.*, Giardina *et al.* 1995).

Alder tolerance of low soluble-P levels in the soil is due to the plant's ability to release active phosphatases in root exudates that break down organic-P compounds, together with its ability to form symbioses with a wide variety of fungi that facilitate P uptake (Roy *et al.* 2007; Lorenc-Plucińska *et al.* 2013; Walker *et al.* 2014). Indeed, symbioses with endomycorrhizal fungi are known to facilitate not only P acquisition by host plants, but also the acquisition of other essential ions in the early stages of growth as well. The presence of this type of association tends to be more limited in mature plants (Molina *et al.* 1994; Polme *et al.* 2013). Alders also can form symbioses with ectomycorrhizal fungi (ECM). Unlike several ectomycorrhizal plants, alders form such symbioses with a limited number of fungal species (Molina 1981; Godbout & Fortin 1983; Tedersoo *et al.* 2009; Kennedy *et al.* 2014, 2015). These fungi are believed to have specialised towards the acquisition of P (Walker *et al.* 2014).

Xu *et al.* (2015) also reported that *Alnus nepalensis* D. Don (Uti or Nepalese alder) formed associations with several dark septate endophytes (DSE), *i.e.*, a miscellaneous, likely paraphyletic group of ascomycetous melanised, septate fungi that colonise roots (Jumpponen & Trappe 1998; Mandyam *et al.* 2010). The nature of the interaction between DSE and their host plants has been the subject of several studies, where effects on host plants has ranged from negative (Wilcox & Wang 1987; Stoyke & Currah 1993; Tellenbach *et al.* 2011; Reininger *et al.* 2012; Mayerhofer *et al.* 2013) to positive (Jumpponen & Trappe 1998; Newsham 1999; Upson *et al.* 2009; Newsham 2011). DSE-host combination, together with environmental and growth conditions, are considered as keys to understanding the variable effects of such interactions (Mandyam & Jumpponen 2005; Newsham 2011; Mayerhofer *et al.* 2013). Yet, the potential ability of DSE to breakdown complex organic molecules, thereby increasing essential nutrient levels such as P in the rhizosphere (Jumpponen *et al.* 1998; Upson *et al.* 2009; Mandyam *et al.* 2010; Della Monica *et al.* 2015), together with the ability of certain strains to produce auxin (IAA) (Berthelot *et al.* 2016), could promote plant

growth, even on metal-contaminated soils (Berthelot *et al.* 2016). Thus, DSEs are potentially of great interest in the development of rehabilitation strategies.

Evaluating the tolerance of alders and their symbionts to heavy metal stress is key to developing new biotechnology, given that micro-organisms can help plants overcome certain limitations, such as slow growth in metal-contaminated environments (Rajkumar *et al.* 2012). Some studies have addressed the tolerance of alders and the actinorhizal symbiosis, demonstrating that alders and their actinorhizal symbionts are tolerant to heavy metals and, thus, good candidates for phytostabilisation approaches (Lorenc-Plucińska *et al.* 2013; Bélanger *et al.* 2015). Nevertheless, the study of other microorganisms that form associations with alders, such as DSE and ECM, is also warranted.

The study of the fungal symbionts of alder is of particular interest with respect to phytostabilisation, as several studies have shown that ECMs can alleviate metal toxicity in plants (Godbold *et al.* 1998; Jentschke & Godbold 2000; Schützendübel & Polle 2002). Even if mechanisms underlying the relationship between DSE and host plants are not well understood, studies have definitely shown their association with plant roots on metal-contaminated sites (Vrålstad *et al.* 2002; Regvar *et al.* 2010; Zhang *et al.* 2013). Furthermore, they may be of interest, given that shifts in fungal community structure from ECM towards DSE have been reported in extreme environments (Colpaert *et al.* 2011) and colonisation patterns of roots do not seem to have been affected by metal toxicity (Deram *et al.* 2011). Furthermore, it has been reported that some plants that are colonised by DSE show increased growth and reduced metal uptake in metal-contaminated soils (Likar & Regvar 2013; Berthelot *et al.* 2017).

Selecting metal-tolerant fungal endophytes can be viewed as a pertinent first step in developing optimal partnerships between alders and fungi that can be used in phytostabilisation strategies on metal-contaminated soils. In this study, the tolerance of alder fungal endophytes to copper, nickel, zinc and arsenic, together with acidic pH,

was investigated. Root endophytes were isolated from *Alnus incana* ssp. *rugosa* (Du Roi) R.T. Clausen (speckled alder, hereafter referred to as AR) and *A. alnobetula* (Ehrh.) K.Koch ssp. *crispa* (Aiton) Raus (green alder, hereafter referred to as AC), which were located on various contaminated and disturbed environments. Inoculations of host plants with the isolated fungi were performed in order to validate their endophytic status. Last, growth trials were performed to characterise the effects of the various endophytes on their hosts.

Materials and Methods

Root Sampling

Roots were collected from two alder species, *Alnus incana* ssp. *rugosa* (AR) and *Alnus alnobetula* ssp. *crispa* (AC), which were growing in soils affected by human activities in various regions of Québec, Canada. The collected plants were growing in sites that had been perturbed by mining activities (tailing ponds and waste rock piles), and those within the vicinity of engineered structures (dike, bicycle path, unpaved road, highway and cemetery). Table 1 summarises the list of the sampled sites, which were labelled A to K. Plants from sites B, D, E and F were growing in soils that had been contaminated with metals. The leachate from these sites exceeded regulatory levels for discharges into the environment, which were set by Quebec Ministry of Sustainable Development, Environment and the Fight against Climate Change (MDDEP 2012).

Table 1 – Quebec harvest sites that were used for the collection of roots from *Alnus incana* ssp. *rugosa* (AR) and *Alnus alnobetula* ssp. *crispa* (AC).

Site designation	Site description	Sub-region	Alder subspecies
A	Mining site – Waste rock pile	Eastern Townships	AR, AC
B	Closed mining site – Tailing pond	Northern Québec	AR
C	Closed mining site – Dike	Northern Québec	AR
D	Closed mining site – Tailing pond	Abitibi	AR
E	Mining site – Waste rock pile	Abitibi	AR, AC
F	Mining site – tailing pond	Abitibi	AR
G	Mining site – Waste rock pile	Côte-Nord	AR
H	Highway	Eastern Townships	AR
I	Cemetery – Land fill	Eastern Townships	AR
J	Unpaved road	Eastern Townships	AR
K	Bicycle path	Eastern Townships	AR

Roots were sampled with the surrounding substrate to a depth of 5 to 15 cm beneath the ground surface, but large stones were carefully removed. Roots were maintained at 4 °C for one to two weeks prior to fungi isolation.

Endophytic Fungi Isolation

Roots were carefully washed with tap water to remove soil and other debris. To ensure that only alder roots were used for the isolation of fungi, roots that did not connect to a nodule were discarded. Roots were observed using a MSZ-1B Nikon binocular scope at 10× magnification to ensure that they were not damaged while being harvested. Selected roots were then sectioned into 2 to 3 mm lengths and surface sterilised. Half of the segments were sterilised as previously described by Molina and Palmer (1982), with 0.01 % Tween-80 solution used as detergent and 30 % aqueous H₂O₂ as the sterilisation agent. Sterilisation times of 10 s and 30 s were used respectively for half

of the segments in this group (a quarter of total segments). The other half of the segments were sterilised as previously described by Yamada *et al.* (2001), with 0.01 % Tween-80 solution and 0.005 % Tween-80 solution used as detergents, and 1 % aqueous calcium hypochlorite as the sterilisation agent. Sterilisation times of 15 s and 60 s were used respectively for half of the segments in this group (a quarter of total segments). (Yamada *et al.* 2001).

Root segments were placed individually on pH 5.7 MMN (modified Melin-Norkrans) medium plates and incubated at room temperature (about 22°C) (Marx 1969). Plates were observed daily for the presence of fungal colonies. When a fungal colony attained a radius of about 3 cm, 50 mg of tissue and underlying medium were removed for fungal identification. After initial identification (see below), a 1-cm radius mycelial plug was harvested from the edge of selected colonies and placed onto fresh antibiotic-free medium. This process was repeated 3 to 4 times before secondary identification. For conservation purposes, colonies were transferred to fresh medium every 3 months.

Fungal strains and culture conditions

Fungal strains that were isolated in this study are listed in Table 2. In addition to these strains, three ECM strains were included in this study that had been obtained from the University of Alberta Mold Herbarium and Culture Collection (UAMH): *Paxillus involutus* 8235 (PI8235), *Hebeloma crustuliniforme* 5247 (HC5247) and *Alpova diplophloeus* 6193 (AD6193). These three strains belong to species that have been previously reported as symbionts of either AC or AR, and which were used as positive controls (Molina 1981; Godbout & Fortin 1983).

Fungi were cultivated in the dark at room temperature (about 22 °C) on pH 5.7 MMN medium containing 1.2 % agar. For isolation, streptomycin (50 µg/L) and ampicillin (50

µg/L) were added to the culture plates to prevent bacterial contamination. The MMN was adjusted to lower pH values using 1 N HCl to test growth of the isolates under acidic conditions.

Metal tolerance of the fungal isolates was also tested on MMN plates. The growth medium was amended with metals and prepared by adding 100 mL of metal solution (10×) to 900 mL of MMN (1.1×) that was adjusted to pH 4.3 to insure metal availability (Blaudez *et al.* 2000). Metal solutions, which were filtered using a 0.45 µm membrane (Millipore, Burlington, MA, USA), were added after autoclaving to avoid precipitation. The final concentrations were Cu²⁺ as CuSO₄ at 60 and 150 mg/L, Ni²⁺ as Ni(CH₃COO)₂ at 30 and 50 mg/L, Zn²⁺ as ZnSO₄ at 125 and 225 mg/L, and As³⁺ as Na₂HAsO₄ at 50 and 150 mg/L.

Fungal inocula that were used in plant colonisation assays were prepared in a vermiculite carrier (Likar & Regvar 2013) as follows. A full fungal colony (about 5-cm radius) that was grown on an MMN plate was cut roughly in 0.5-cm pieces and added to vermiculite (500 mL) that had been moistened with 250 mL of MMN liquid medium before being incubated for two weeks in the dark at room temperature.

Fungal Identification

Phylogenetic analysis was based upon sequencing of the ITS1-5.8S-ITS2 region (ITS). Total DNA from each colony was extracted using REDExtract-N-AmpTM Plant PCR Kit (Sigma-Aldrich Canada, Oakville, ON, Canada) according to manufacturer instructions. PCR amplification was initially carried in a volume of 25 µL containing: 12.5 µL of REDExtract-N-AmpTM PCR ReadyMixTM, 1.25 µL of 10 µM primers ITS_1F and ITS_4 (White *et al.* 1990) and 10 µL of biomolecular-grade water. The amplifications were performed on an S1000 Thermal Cycler (Bio-Rad, Mississauga, ON) under the

following conditions: an initial pre-denaturing step at 95 °C for 2 min, 29 cycles at 95 °C for 40 s, 46 °C for 30 s, 72 °C for 60 s, and a final extension step at 72 °C for 7 min.

PCR amplification products were sequenced at the Plateforme de séquençage et génotypage des génomes (Centre de recherche du CHU, Québec, QC, Canada) using an ABI 3730xl DNA analyser (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). As a first step in screening, only sequencing with the forward primer was performed. Sequencing using both forward and reverse primers was performed later on samples appearing to be taxonomically associated with either mycorrhizal fungi or DSE. ITS sequences were compared to sequences from the GenBank database using the National Center for Biotechnology Information's (NCBI) Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). Neighbour-joining analysis (Saitou & Nei 1987; Studier & Keppler 1988) was performed using Clustal Omega software (Sievers et al. 2011), with *Spiromyces spiralis* Benny & R.K. Benjamin (Zoopagomycota) being used as the outgroup.

Validation of Endophytic Status

To validate whether or not isolates are actual endophytes, each isolate was used to inoculate either AR or AC according to the plant species from which it was isolated.

Seeds of AR (National Tree Seed Centre of Canada [NTSC], lot 8421707.0) and AC (NTSC, lot 8421722) were sterilised and germinated, as previously described by Bélanger *et al.* (2011). Plant growth chamber conditions were as follows: a regime of 16 h light at 22 °C and 8 h dark at 18 °C; illumination of 500–600 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$. After a 6-week growth period, plants were transferred to pots containing a 1:1 sterilised sand/perlite mixture. Pots were placed inside clear sterilised containers with two openings to allow air flow. Openings were covered with a 0.20 μm membrane (Millipore, USA) to prevent contamination. Thirty mL of fungal inoculum were mixed into the

rooting medium prior to plant transfer. The plants were grown for an additional 16 weeks in a growth chamber. The plants were watered weekly with 5 mL of Hoagland's solution 0.1× (Hoagland & Arnon 1950). During the first 6 weeks following transfer, 5 g/L of dextrose were added to the watering solution.

After this growth period, roots inoculated with known symbionts that formed ECM hyphal mantles (HC5247, PI8235, AD6193, ACCG15 [identified as *Sebacina* sp.] and ACCG6 [identified as *Tomentella* sp.]) were harvested, carefully washed, and observed with a Nikon SMZ800 binocular scope at 10× magnification. All other roots were carefully washed and cleared by boiling them in a 10% w/v aqueous KOH for 20 min. Root segments were then observed at 200× and 400× with an Axio Imager M1 light microscope (Carl Zeiss AG, Göttingen, Germany). When no fungal hyphae were observed within the roots, they were stained using the ink and vinegar method (Vierheilig *et al.* 1998) and observed again to detect the presence of endophytic fungal hyphae.

When endophytic status was confirmed for a given strain, isolation procedures were performed on the infected roots, as previously described. Thirty days following sterilisation, a 5-mm mycelium plug was cut from the edges of the actively growing colonies and transferred to fresh MMN medium. Thirty days following after this transfer, the phenotype of the reisolated strain was compared to that of the inoculated strain in order to validate Koch's postulates.

Metal/Metalloid and pH Tolerance

Selected isolates, together with the three ECM strains (PI8235, HC5247, AD6193) were tested for their tolerance to elements that were found in the contaminated sites, *i.e.*, copper (Cu), zinc (Zn), nickel (Ni) and arsenic (As), as previously described by Blaudez

et al. (2000). Briefly, 5-mm diameter plugs were harvested from the edges of actively growing colonies and transferred to a fresh medium that had been amended with one of the four elements being tested. Tolerance of the strains to each metal was estimated by determining the time required (in days) by the colonies to reach a 1-cm radius. Each experiment was carried out with 12 replicates. Controls, one per strain, were carried on MMN medium free of metals. A similar experiment also was performed to compare pH tolerance between isolates, with pH 5.7 being used as a control.

Non-parametric statistical methods were used to compare tolerance to metals and acidity both within and between isolates. For each test condition, the time (days) that was required by each individual replicate of the same isolate ($n = 12$) to reach the 1-cm radius were ordered from highest to lowest. The same procedure was done for the negative control of each strain. Growth times for each rank of the tested conditions were then divided by the corresponding rank of the negative control. As our statistical analysis were performed on these ratios, our data could not be normally distributed, whether our growth times were normally distributed or not. Therefore, conditions were indicated by cumulative normal plots of the ratios that were summarised as boxplots, *i.e.*, the median or 50th-percentile of the cumulative distribution, and the 25th- and 75th-percentiles delimiting the 'box' (data summaries shown in the figures).

The median ratio (considered as rank values) of the 12 replicates per isolate were ranked across the 23 isolates, followed by Kruskal-Wallis ANOVA and subsequent multiple pairwise comparisons of median ratios (ranks). The responses ranged from ratios that were very low to zero to values that were equal to or greater than 1.0, *i.e.*, performance of the isolate on metal-amended or acidity adjusted Petri plates was better than growth on the comparable control.

Rank-response plots were created by ordering each isolate from highest to lowest. From these rankings, the performance of each isolate could be globally compared across experiments.

A heatmap was created to visualise the sequencing data *versus* the responses of the isolates to heavy metal amendments and adjustments to growth medium acidity. In this two-dimensional depiction of responses, the isolates form rows and the relationships between their gene sequences are visualised as a dendrogram. The dendrogram was calculated using a complete linkage-clustering algorithm, employing the Manhattan metric as a measure of distance. Columns in conventional genomic heatmaps depict a series of samples. In the current study, the columns represented the responses of the isolates to Cu^{2+} 150 mg/L, Ni^{2+} 50 mg/L, Zn^{2+} 225 mg/L, As^{3+} 150 mg/L and pH 2.

Results

Isolation, identification of fungal strains and validation of endophytic status

Four sterilization methods were used to isolate endophytic fungi. This was done to ensure that the sterilisation method did not exclude certain types of endophytic fungi relative to others. No one sterilisation method outperformed the others. Pearson correlation analysis between the number of isolates that were identified as mycorrhizal fungi or DSE per sterilisation method *versus* the number of root segments that were treated per sterilisation method yielded a result of $r = 0.91$ (data not shown), suggesting that no sterilisation procedure was more efficient in isolating mycorrhizal or DSE fungi. A second correlation analysis between the total number of isolates per sterilisation method *versus* the number of root fragments treated per sterilisation method yielded similar results ($r = 0.94$). Furthermore, there were no significant shifts in the taxa obtained when using a sterilisation *versus* another (data not shown).

In order to isolate endophytic strains of interest for phytostabilisation strategies using alders, 539 root segments that were placed on Petri dishes, of which 365 produced fungal colonies. Seventy-three Petri dishes were discarded as two or more fungal colonies were intermingled. The PCR products of 83 isolates were of insufficient quality and were discarded. The ITS1-5.8S rDNA-ITS2 region of 209 fungal isolates (forward strand only) was amplified and sequenced. Fifty of these showed sequence similarity ($\geq 95\%$) with those of mycorrhizal fungi or DSE when compared to previously identified fungi in GenBank. Table 2 presents the origin of potential mycorrhizae or DSE.

Table 2: Origins of potential mycorrhizal or DSE endophytes per host plant per site; a total of 539 root segments were analysed from the 11 sites.

Site ¹	Host plant	Number of root segments analysed	Number of isolates	Number of potential mycorrhizae or DSE ⁴
A	AR ²	90	73	2
	AC ³	84	53	3
B	AR	29	17	4
C	AR	54	49	13
D	AR	22	20	4
E	AR	12	5	0
	AC	27	26	0
F	AR	34	29	6
G	AR	33	21	4
H	AR	7	1	0
I	AR	10	7	3
J	AR	15	0	0
K	AR	122	64	11

¹Site descriptions are in Table 1; ²*Alnus incana* ssp. *rugosa*; ³*Alnus alnobetula* ssp. *crispa*; ⁴Identification of potential mycorrhizal fungi or dark septate endophytes (DSE) was determined by comparing the ITS1-5.8S-ITS2 region that was sequenced with the forward primer to previously sequenced fungi that are available at GenBank (<ftp://ftp.ncbi.nih.gov/>).

Sequencing of both forward and reverse strands of these 50 isolates led to the identification of 20 distinct strains. Sixteen fungal isolates showed 100 % sequence homology with at least one other isolate. Isolates sharing 100 % sequence homology came from the same sample site and, thus, only one isolate from each group was used for further analyses. Table 3 lists the selected strains, together with their GenBank accession numbers.

Table 3: Nearest GenBank neighbours to the selected fungal strains.

Strain	GenBank accession number	Number of isolates	Host	Site ³	Nearest GenBank neighbour	GenBank accession no. of the neighbour	Identity (%)
ACCG6	MH029247	2	AC ¹	A	<i>Tomentella</i> cf. <i>ellisii</i>	KC782507	96.2
ACCG15	MH016787	1	AC	A	<i>Sebacina</i> sp.	HQ154358	98.6
JP10	MH029265	1	AR ²	B	<i>Phialocephala bamuru</i>	MG195534	98.5
JP21	MH029251	1	AR	B	<i>Rhizoscyphus ericae</i>	AM887700	95.9
JN10	MH029257	2	AR	C	<i>Cryptosporiopsis</i> sp.	KT268764	99.8
JN11	MH029263	4	AR	C	<i>Phialocephala fortinii</i>	LC131022	99.5
JN14	MH029248	1	AR	C	<i>Meliniomyces bicolor</i>	HQ157926	99.8
JN21A	MH029264	1	AR	C	<i>Phialocephala lagerbergii</i>	AB190400	99.1
JN22	MH029252	1	AR	C	<i>Meliniomyces bicolor</i>	HM190124	99.5

JN25	MH029256	1	AR	C	<i>Pezicula melanigena</i>	KY977594	100.0
JN31 ⁴	MH029250	1	AR	C	<i>Rhizoscyphus ericae</i>	JQ711893	98.9
JN33 ⁴	MH029249	1	AR	C	<i>Cadophora finlandica</i>	NR_121279	99.6
DB15 ⁴	MH029253	1	AR	D	<i>Oidiodendron echinulatum</i>	DQ069040	100.0
DR9 ⁴	MH029254	6	AR	F	<i>Pezicula melanigena</i>	KY977594	100.0
Cim7	MH029262	3	AR	I	<i>Cadophora</i> sp.	MG076773	100.0
AN2	MH029258	2	AR	K	<i>Cadophora</i> sp.	MG076773	99.8
AN75	MH029260	1	AR	K	<i>Cadophora</i> sp.	MG076773	99.7
AN77	MH029255	1	AR	K	<i>Cryptosporiopsis</i> sp.	KT268764	99.8
AN97	MH029259	3	AR	K	<i>Cadophora</i> sp.	MG076773	100.0
AN115	MH029261	1	AR	K	<i>Cadophora</i> sp.	MG076773	99.7

¹*Alnus alnobetula* ssp. *crispa*; ²*Alnus incana* ssp. *rugosa*; ³Site descriptions are in Table 1; ⁴These strains did not form endophytic structures in inoculation trials.

Four distinct groups emerged from the phylogenetic analysis of the selected strains (Fig. 1). All were subgroups in the Order *Helotiales* (*Ascomycota*). Group 1 contained closely related strains of the *Cryptosporiopsis* genus, a known DSE genus. Groups 2 and 3 contained members of the genera *Phialocephala* and *Cadophora*, respectively; both genera are known to be DSE (Garbaye 2013). Finally, Group 4 was composed of various members of the *Rhizoscyphus ericae* aggregate, which contains species that recognised as forming ericoid mycorrhizae with ericoid hosts (Vohn *et al.* 2013).

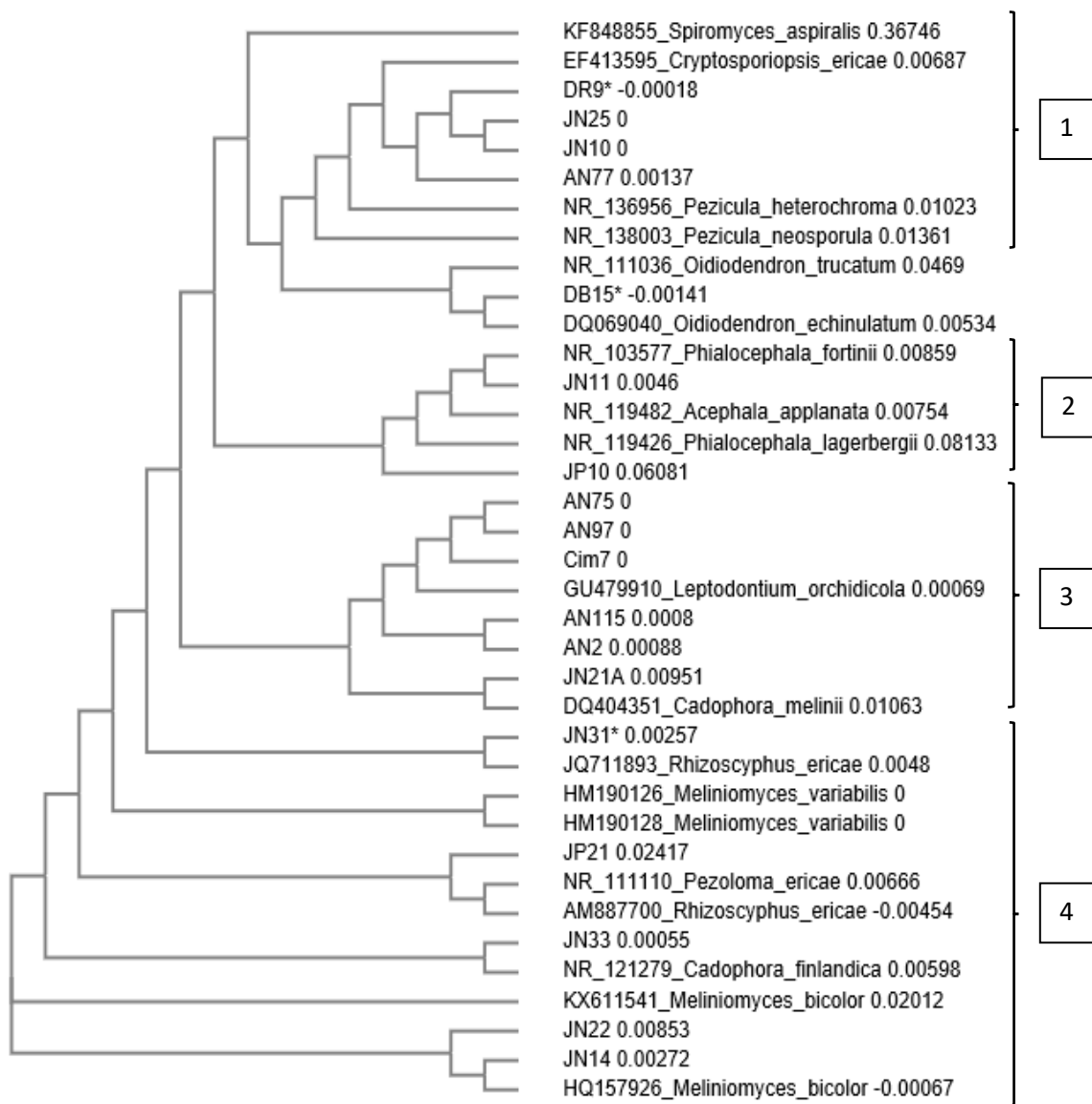


Fig. 1: Neighbour-joining analysis showing the position of strains based upon ITS1-5.8S rDNA-ITS2 sequences, with *Spiromyces spiralis* as the outgroup. Strains not forming endophyte structures in the inoculation trial are marked with an asterisk (*). Strains ACCG6 and ACCG15 were excluded from the analysis, as they were isolated from alders that were produced in a greenhouse and planted on waste rock piles as part of a rehabilitation effort, making it is impossible to ascertain whether the fungi originated from the surrounding environment or from the greenhouse.

Validation of endophytic status

As most of the strains identified were not known endophytes for AR and AC, root colonisation essays were performed. Validation of endophytic status being essential to determine if fungi were not simply in the rhizosphere and if they were potential candidates for alder inoculation.

All selected strains formed endophyte structures in alder plants, with the exception of JN31, JN33, DB15 and DR9. Of the three ECM strains that were obtained from UAMH, only *H. crustuliniforme* 5247 did not form hyphal mantles on roots.

Like the control strains *P. involutus* 8235 and *A. diplophloeus* 6193, strains ACCG6 and ACCG15 formed typical ECM hyphal mantles on roots. These structures, however, were few in number, their occurrence on roots varying between 0 and 2 per plant (data not shown).

Strain JN25 from Group 1 and all strains from Group 2 exhibited inter- and intracellular hyphal colonisation and formed microsclerotia. All other strains showed a hyphal colonisation pattern that was similar to Group 2. No particular structure, whether ericoid mycorrhiza or microsclerotium, were observed. Typical observations of root colonisation are shown in Fig. 2.

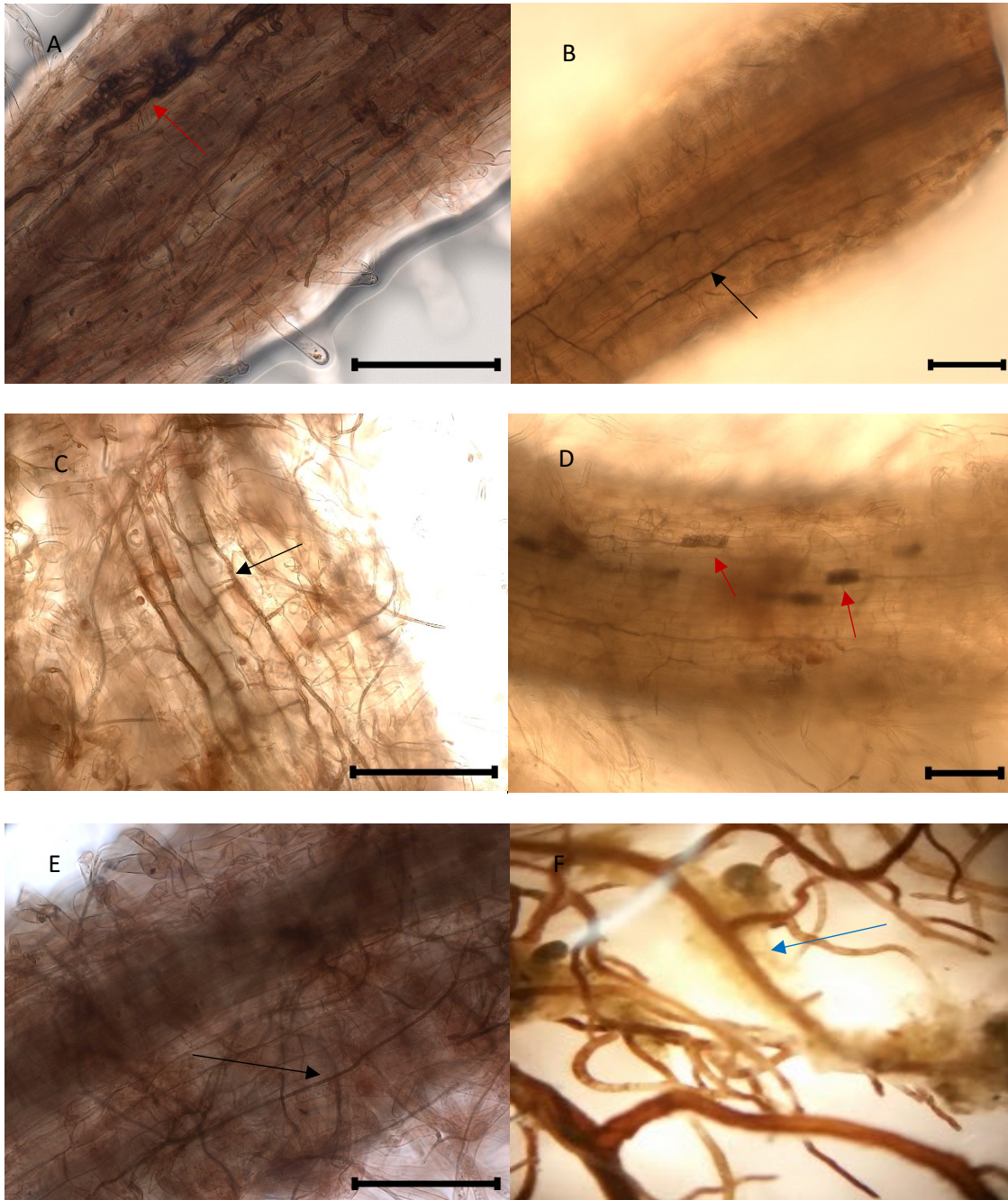


Fig. 2: Root colonisation by various endophytes. Scale bar represents 100 μm . Black arrows show fungal hyphae, red arrows are microsclerotia and blue arrows are hyphal mantles. A, strain JN25; B, strain JN11; C, strain JN14; D, strain AN115; E, strain JN22 and F, strain ACCG15; observed with a binocular scope (10 \times).

Copper, nickel, zinc, arsenic and acidic pH tolerance

As phytostabilisation approaches are based on the growth of plants and microorganisms in metal contaminated soils, tolerance essays to four metals (arsenic, copper, zinc and nickel) and various acidic condition were conducted.

To ensure that the method used to evaluate metal tolerance and pH tolerance yielded consistent results, a one-way ANOVA was performed on the growth results obtained by three identical conditions, one from each of the three experiments performed (i.e. the two controls in the metal tolerance tests and the pH 4.3 conditions in the pH tolerance test). 23 separate ANOVA were performed, that is one for each of the isolate. Although *P*-values exhibited a broad range among strains, no strain showed results that were statistically significant from one test to another ($P > 0.10$) (data not shown).

Detailed ranking results of strain tolerances can be found in Fig. 3 and Appendix 1. For all metals that were tested, growth rates relative to the metal-free controls diminished as metal concentrations increased. Yet, inhibition of growth also varied relative to the metal that was being tested. Ni^{2+} strongly inhibited growth. Indeed, isolate growth relative to the control at 30 mg/L of Ni^{2+} was systematically lower than 75 % (data not shown) and most strains (65 %) showed no growth at 50 mg/L (see Fig. 5). As^{3+} , in contrast, had very few adverse effects on relative growth. At 50 mg/L As^{3+} (Fig. 7), median growth rates of the isolates (as the percentage ratio of the amendment to the control) were higher than 1 (or 100 %) for strains AN2 (151 %), ACCG15 (147 %), ACCG6 (144 %), JN25 (141 %), AN115 (143 %), AN97 (126 %), JN21A (115 %), JN14 (111 %), AN77 (110 %), JN22 (108 %), DB15 (107 %), and Cim7 (107 %). At 150 mg/L As^{3+} , ACCG6 and ACCG15 also showed significant growth increases relative to their controls of 105 % and 104 %, respectively (Fig. 8). Even though As^{3+} showed growth

stimulation at 50 mg/L, it still followed the general trend observed for other metals, growth rates falling at 150 mg/L.

No particular patterns could be observed for the lowest concentration for all metals that had been tested with respect to taxon or site of origin (data not shown). This was also the case concerning trials with Cu^{2+} and As^{3+} at 150 mg/L. Yet, growth trials with media amended with 50 mg/L Ni^{2+} or 225 mg/L Zn^{2+} , revealed greater tolerance in members of the Order *Helotiales*. Site of origin also was apparently important in regards to Ni^{2+} and Zn^{2+} tolerance, given that all strains showing growth on 50 mg/L Ni^{2+} (*cf.* Cim7) and all strains that were not inhibited on 225 mg/L Zn^{2+} , had been isolated from adjacent sites B and C. Presence of metals in the substrate of origin did not affect tolerance ranking under any condition.

Growth of most fungi was similar to the control at pH values of 4.3 and 3. At pH 3, two strains exhibited relative growth lower than 75 %, *i.e.*, ACCG6 (60 %) and HC5247 (58 %), while two were completely inhibited (AD6193 and ACCG15; data not shown). At pH 2, all fungi that were capable of growth belonged to the *Ascomycota*, except for PI8235. Rankings at pH 3 also showed the same pattern, with members of the *Basidiomycota* being at the lower end of the scale (except for PI8235), but still showing some growth.

Clustering, as shown in the heatmap in Figure 3, did not reveal particular patterns. Some closely related strains that originated from the same site clustered together, such as JN14 and JN22 or AN115, AN2 and AN97, but this pattern does not extend to similar taxa originating from different sites. While strains JN14, JN22, JP21, JN10 and JN11 originated from two contiguous sites and clustered together, other strains from these sites clustered with other non-related strains. Given that no other site-of-origin clustering occurs, this pattern cannot be generalised and could be attributed to chance

events. Clustering of conditions in the heatmap did not yield significantly related results, with detailed examination of strain responses to each condition showing highly variable results.

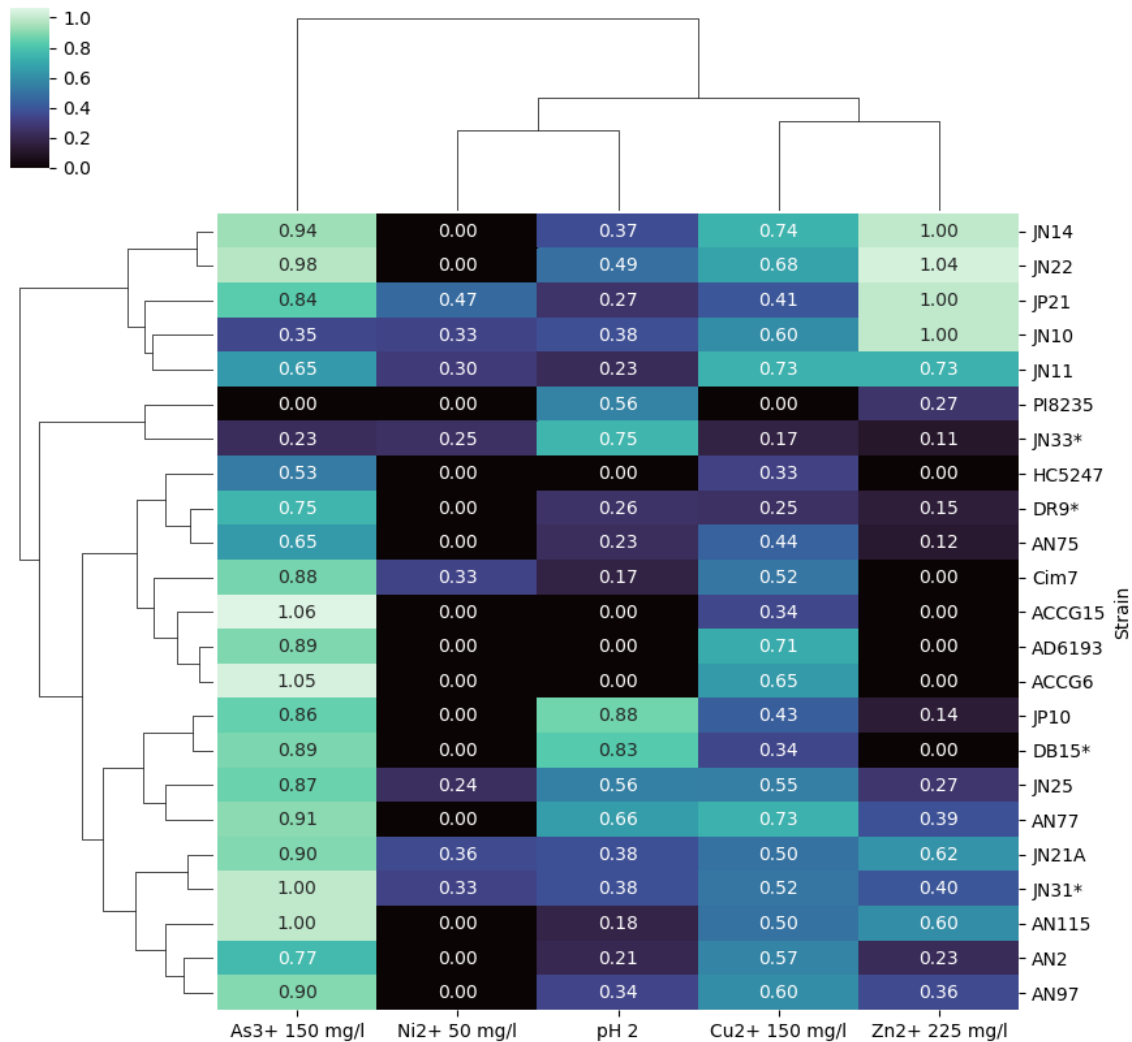


Fig. 3: Rank per strain in media amended with metals (pH 4.3) or at pH 2 without metal. Strains not forming endophytic structures in the inoculation trial are marked with an asterisk (*). The heatmap was drawn using complete-linkage clustering and the Manhattan metric to calculate distances. Detailed figures can be found in Appendix 1.

Discussion

The main objectives of the current study were met in terms of isolating and characterising fungal endophytes, which could be used in further research using AR and AC for phytostabilisation of metals.

The use of different sterilisation methods to insure a wider array of endophytes does not seem necessary. The lack of significant variation in results for various sterilisation methods or sterilisation times could be explained by the protection that was offered to the endophytes by the roots themselves. The disparity between conditions that are required to efficiently sterilise microorganisms both on the root surface and within the root appears to be sufficiently large to allow several sterilisation techniques and protocols.

Site location or characteristics apparently allowed for the isolation of unknown AR and AC fungal endophytes. No isolates were identified as a previously reported ECM endobiont of *Alnus* sp. (Tedersoo *et al.* 2009) but were rather identified as DSE, as the origins of strains ACCG6 and ACCG15 could not be ascertained. Presence of DSE fungi on poor and contaminated soils has been widely reported (Mandyam & Jumpponen 2005; Likar & Regvar 2013; Zhang *et al.* 2013; Berthelot *et al.* 2017) and all collection sites had been disturbed by human activities. As such, their presence was expected. The lack of ECMs, however, was rather surprising, given their presence in roots that are growing in contaminated or disturbed soils has been widely reported, although not specifically for *Alnus* sp. (Blaudez *et al.* 2000; Adriaensen *et al.* 2006; Colpaert *et al.* 2011). It could be argued that the sterilization method used was too stringent for ECM while allowing DSE to survive. This, however, does not seem likely. First, four distinct sterilisation methods were used and none showed significant variations as per the type of fungi isolated. Second, these methods were designed and have been used to isolate ECM rather than DSE (Molina & Palmer 1982, Yamada

2001). Finally, isolation essays conducted in order to validate Koch's postulates included four ECM (ACCG6, ACCG15, PI8235 and AD6193) and none of them were destroyed in the sterilization process. Low levels of active mycorrhizal propagules in mine tailings, together with the ubiquitous presence of DSE, could explain their appearance on mining sites, while ECM fungi are still absent (Jumpponen et al. 1998; Bois et al. 2005).

Soil variables have also repeatedly been identified as key drivers of the endophytic fungi community of the genus *Alnus* (Tedersoo et al. 2009; Polme et al. 2013; Roy et al. 2013). Therefore, it should not be surprising that a shift could occur, away from previously described community structures that are mostly composed of ECM, with a large proportion belonging to *Tomentella-Thelephora* or *Hebeloma-Alnicola* lineages (Tedersoo et al. 2009; Kennedy & Hill 2010; Polme et al. 2013; Roy et al. 2013) in highly stressful environments, especially since *Alnus* root-associated fungi communities have shown some sensitivity to neighbourhood effects (Bogar & Kennedy 2013). However, further studies regarding the development of alder fungal communities on disturbed sites would be required to fully understand these results.

Although not the primary focus of these essays, our study has yielded several results furthering our understanding of AC and AR's fungal endophytes. Three strains were included to this study as positive controls for inoculation trials. UAMH strains *A. diplophloeus* 6193 and *P. involutus* 8235 confirmed their capacity to form ECM with both *A. incana* (Molina 1981; Godbout & Fortin 1983) and *A. alnobetula* (Godbout & Fortin 1983). UAMH *H. crustuliniforme* 5247 did not form ECM structures on root tips, contrary to its symbiotic status that was previously reported by Godbout and Fortin (1983). As argued by Tedersoo et al. (2009), some associations that are formed in aseptic trials using aggressively growing pioneer fungi could be described as "semicompatible," exhibiting fragmented mantles and minimal development of the Hartig net (Massicotte et al. 1999). The low degree of colonisation in the trial conducted

by Godbout and Fortin and the absence of other such results, to our knowledge, could explain the absence of ECM formation in our trial.

Other *Basidiomycota* that were isolated in this work included strains ACCG6 and ACCG15, which were closely related to *Tomentella ellisii* and *Sebacina* sp. *Tomentella ellisii* (Tedersoo *et al.* 2009) and other members of the genus *Tomentella* (Becerra *et al.* 2005; Roy *et al.* 2013) have been previously reported as symbionts of *Alnus*. *Sebacina* sp. has also been reported as a symbiont of various species of *Alnus* (Roy *et al.* 2013).

All other isolates were members of the Order *Helotiales* (*Ascomycota*). Putative *Ascomycota* generalist ECM fungi were identified by Tedersoo *et al.* (2009) as symbionts of *Alnus* spp. Yet, the distribution of our isolates more closely reflected the DSE community associated with the roots of *Alnus nepalensis* that was described by Xu *et al.* (2015), who found them in mine tailings. To our knowledge, members of the genera *Cryptosporiopsis* and *Rhizocyphus* are identified here as root endophytes of *Alnus* for the first time.

DSEs are known to colonise roots of a wide variety of plants, with some of these associations being non-mycorrhizal (Jumpponen & Trappe 1998; Garbaye 2013), especially in stressful environments and polluted soils (Mandyam & Jumpponen 2005; Likar & Regvar 2013; Zhang *et al.* 2013; Berthelot *et al.* 2017). The penetration of the root system of *Asparagus officinalis* L. by *Phialocephala fortinii* C.J.K. Wang & H.E. Wilcox, which was described by Yu *et al.* (2001), showed similarities to a weak pathogen or an opportunistic fungus. These peculiarities could suggest that the colonisation of *Alnus* roots by DSE is not subject to developed signalling pathways, as is the case with many other root symbionts (Oldroyd 2013; Daguerre *et al.* 2016; Genre & Russo 2016) and, therefore, the process is mostly under the control of the fungus. The DSE-*Alnus* relationship could thus fall outside the scope of the close reciprocal specificity that is shown by the *Alnus* spp.-ECM community.

Group 4 contained strains that were related to genera known to form ericoid mycorrhizae with ericoid hosts, such as *Rhizoscyphus* and *Meliniomyces*, but no such structures were observed (Vohn et al. 2013; Hambleton & Sigler 2005), as colonisation patterns were similar to those observed with several DSE strains. Mycorrhizal fungi are known to form different types of structures and to follow different colonisation patterns, depending upon the plant host and environmental conditions (Garbaye 2013). Thus, a non-ericoid colonisation pattern in a non-ericoid host was not unexpected. However, additional observations and studies are required to fully understand how these fungi interact with *Alnus* spp. and whether the colonisation patterns that have been observed are typical of this interaction.

The identification of metal tolerant strains for use in phytostabilisation strategies was conducted through metal tolerance trials. These showed that no strain was relatively more resistant than the others to all metal tested. High intra- and interspecific variation in the tolerance of ECM and DSE fungi is well documented in the literature (Egerton-Warburton & Griffin 1995; Hartley *et al.* 1997; Blaudez et al. 2000; Ban *et al.* 2012; Berthelot *et al.* 2016). Furthermore, metal tolerance of certain strains was mostly metal-specific (Blaudez *et al.* 2000; Colpaert *et al.* 2011), given that fungi with tolerance to a wide array of metals have not been identified in *in vitro* studies. The results of our metal tolerance trials, therefore, confirm previous findings.

As argued by Colpaert *et al.* (2011), true metal tolerance should involve mechanisms that transport metal ions from the cytoplasm to the apoplast, as other defence mechanisms eventually could be overloaded. The presence of specific metal transporters, such as P_{1B}-ATPases (Adle et al. 2007; Argüello et al. 2007; Krämer et al. 2007), could actually provide an explanation for high tolerance levels to specific metal ions.

A case could however be made that some fungal taxa generally have a higher constitutive tolerance to metals. Certain tolerance mechanisms, such as sorption to components of the cell wall (e.g., melanins), are not metal-specific and some fungi can chelate a large array of metal ions (Fogarty & Tobin 1996; Bellion *et al.* 2006). Strains belonging to the Order *Helotiales* (*Ascomycota*) showed higher tolerance to Zn^{2+} and Ni^{2+} than their *Basidiomycota* counterparts. Whereas fungi did not show particular growth patterns in terms of Cu^{2+} and As^{3+} tolerance, *Ascomycota* still showed growth. These findings are supported by field observations, where DSE appear to dominate various metal-polluted environments (Likar & Regvar 2009; Likar & Regvar 2013; Zhang *et al.* 2013; Xu *et al.* 2015) or exhibit an increasing presence with increasing metal concentrations (Regvar *et al.* 2010). Higher tolerance to acidic conditions for members of the *Helotiales* is consistent with previous findings, as members of this order are dominant in highly acidic substrates, such as Mor humus (Garbaye 2013).

Interestingly, our study revealed that the presence of 50 ppm arsenic could stimulate the growth of a large number of our strains, even though arsenic performs no known biological function (Tchounwou *et al.* 2012). There are regular reports in the literature suggesting growth-stimulation effects at lower metal concentrations in several fungi (Ngu *et al.* 1998; Kabata-Pendias & Pendias 2001; Bučková *et al.* 2007; Adeyemi 2009). Whether this is due to secondary effects of certain resistance mechanisms, such as methylation or activation of NADPH oxidase activity as seen in immortal human cell lines (Mohammadi-Bardbori & Rannug 2014), further research would be needed to adequately address this question.

This study was intended as a first step in the identification of suitable strains for the inoculation of alders in a phytostabilisation context. Sampling and isolation methods yielded an array of endophytic fungi of potential use on contaminated sites. No specific strain was observed as systematically forming part of the highest-ranking groups. However, results indicate that DSE could be of particular interest. Firstly, they were found in both disturbed and contaminated soils where no ECM seemed present.

Secondly, they showed higher resistance to a larger array of metals than their ECM counterparts. As the impact of DSE colonisation on host plants vary greatly, growth essays seem a pertinent next step to select proper strains for rehabilitation purposes.

In this study, we also used as a selection tool that was based on ranking results (*versus* the metal present in the growing medium). This method was useful and we find that it may be relevant to other researchers who are performing experiments on fungi metal tolerance.

Acknowledgements

The authors thank Daniel Garneau for his assistance with microscopy imaging and the construction of the heatmap. This research was supported by a grant from the Fonds de recherche du Québec – Nature et technologies (FRQNT) through the Programme de recherche en partenariat sur le développement durable du secteur minier to SR. SL gratefully acknowledges receipt of a scholarship from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC). W.F.J. Parsons English language revision.

Bibliography

- Adeyemi, A. O. (2009) 'Bioaccumulation of Arsenic by Fungi', *American Journal of Environmental Sciences*, 5(3), pp. 364–370.
- Adle, D. J., Sinani, D., Kim, H. and Lee, J. (2007) 'A cadmium-transporting P_{1B}-type ATPase in yeast *Saccharomyces cerevisiae*', *Journal of Biological Chemistry*, 282(2), pp. 947–955.
- Adriaensen, K., Vangronsveld, J. and Colpaert, J. V. (2006) 'Zinc-tolerant *Suillus bovinus* improves growth of Zn-exposed *Pinus sylvestris* seedlings', *Mycorrhiza*, 16(8), pp. 553–558.
- Argüello, J. M., Eren, E. and González-Guerrero, M. (2007) 'The structure and function of heavy metal transport P_{1B}-ATPases', *BioMetals*, 20(3–4), pp. 233–248.
- Ban, Y., Tang, M., Chen, H., Xu, Z., Zhang, H. and Yang, Y. (2012) 'The Response of Dark Septate Endophytes (DSE) to Heavy Metals in Pure Culture', *PLoS ONE*, 7(10), pp.1-11.
- Becerra, A., Pritsch, K., Arrigo, N., Palma, M. and Bartoloni, N. (2005) 'Ectomycorrhizal colonization of *Alnus acuminata* Kunth in northwestern Argentina in relation to season and soil parameters', *Annals of Forest Science*, 62, pp. 325–332.
- Bélanger, P-A., Bissonnette, C., Bernèche-D'Amours, A., Bellenger, J-P. and Roy, S. (2011) 'Assessing the adaptability of the actinorhizal symbiosis in the face of environmental change', *Environmental and Experimental Botany*, 74, pp. 98–105.
- Bélanger, P-A., Bellenger, J- P. and Roy, S. (2015) 'Heavy metal stress in alders : Tolerance and vulnerability of the actinorhizal symbiosis', *Chemosphere*, 138, pp. 300–308.

Bellion, M., Courbot, M., Jacob, C., Blaudez, D. and Chalot, M. (2006) 'Extracellular and cellular mechanisms sustaining metal tolerance in ectomycorrhizal fungi', FEMS Microbiological Letters, 254, pp. 173–181.

Berthelot, C., Blaudez, D. and Leyval, C. (2017) 'Differential growth promotion of poplar and birch inoculated with three dark septate endophytes in two trace element-contaminated soils', International Journal of Phytoremediation, 11(56), pp.1118-1125.

Berthelot, C., Leyval, C., Foulon, J., Chalot, M. and Blaudez, D. (2016) 'Plant growth promotion, metabolite production and metal tolerance of dark septate endophytes isolated from metal-polluted poplar phytomanagement sites', FEMS Microbiology Ecology, 92(10), pp. 1–14.

Bhatti, J. S., Foster, N. W., Hazlett, P. W., Forest, C., Box, S. P. O., Marie, S. S. and December, C. P. A. R. (1998) 'Fine root biomass and nutrient content in a black spruce peat soil with and without alder', Canadian Journal of Soil Science, 78, pp. 163–169.

Bissonnette, C., Fahlman, B., Peru, K. M., Khasa, D. P., Greer, C. W., Headley, J. V. and Roy, S. (2014) 'Symbiosis with *Frankia* sp. benefits the establishment of *Alnus viridis* ssp. *crispa* and *Alnus incana* ssp. *rugosa* in tailings sand from the Canadian oil sands industry', Ecological Engineering, 68, pp. 167–175.

Blaudez, D., Jacob, C., Turnau, K., Colpaert, J. V, Finlay, R., Botton, B. and Chalot, M. (2000) 'Differential responses of ectomycorrhizal fungi to heavy metals *in vitro*', Mycological Research, 104 (11), pp. 1366–1371.

Bogar, L. M. and Kennedy, P. G. (2013) 'New wrinkles in an old paradigm: neighborhood effects can modify the structure and specificity of *Alnus* associated ectomycorrhizal fungal communities', FEMS Microbiology Ecology, 83 (2013), pp. 767–777.

Bois, G., Piché, Y., Fung, M. Y. P. and Khasa, D. P. (2005) 'Mycorrhizal inoculum potentials of pure reclamation materials and revegetated tailing sands from the Canadian oil sand industry', *Mycorrhiza*, 15(3), pp. 149–158.

Bučková, M., Godočíková, J. and Polek, B. (2007) 'Responses in the mycelial growth of *Aspergillus niger* isolates to arsenic contaminated environments and their resistance to exogenic metal stress', *Journal of Basic Microbiology*, 47(4), pp. 295–300.

Colpaert, J. V., Wevers, J. H. L., Krznaric, E. and Adriaensen, K. (2011) 'How metal-tolerant ecotypes of ectomycorrhizal fungi protect plants from heavy metal pollution', *Annals of Forest Science*, 68(1), pp. 17–24.

Daguerre, Y., Plett, J. M. and Venneault-Fourrey, C. (2016) 'Signaling pathways driving the development of ectomycorrhizal symbiosis', in Martin, F. (ed.) *Molecular Mycorrhizal Symbiosis*. Wiley and Hoboken, USA, pp. 141–157.

Dawson, JO, Funk, DT. (1981) Seasonal change in foliar nitrogen concentration of *Alnus glutinosa*. *Forest Science*.27:239-243.

Deram, A., Languereau, F. and Haluwyn, C. V. A. N. (2011) 'Mycorrhizal and Endophytic Fungal Colonization in *Arrhenatherum elatius* L. Roots According to the Soil Contamination in Heavy Metals', *Soil and Sediment Contamination*, 20(1), pp. 114–127.

Diem, H. G. (1996) 'Les mycorhizes des plantes actinorhiziennes', *Acta Botanica Gallica*, 143(7), pp. 581–592.

Egertonwarburton, L. M. and Griffin, B. J. (1995) 'Differential Responses of *Pisolithus tinctorius* Isolates To Aluminum in-Vitro', *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne De Botanique*, 73, pp. 1229–1233.

Fogarty, R. V. and Tobin, J. M. (1996) 'Fungal melanins and their interaction with metals', *Enzyme and Microbial Technology*, 19(June 1995), pp. 311–317.

Garbaye, J. (2013) La symbiose mycorhizienne: Une association entre les plantes et les champignons, Éditions Quae, Versailles, pp. 1-280.

Genre, A. and Russo, G. (2016) 'Does a common pathway transduce symbiotic signals in plant-microbe interactions?', *Frontiers in Plant Science*, 7(96), pp. 1–8.

Giardina, CP, Huffman, S, Binkley, D, Caldwell, BA. (1995) 'Alders increase soil phosphorus availability in a Douglas-fir plantation' *Canadian Journal of Forest Research* 25:1652-1657.

Godbold, D. L., Jentschke, G., Winter, S. and Marschner, P. (1998) 'Ectomycorrhizas and amelioration of metal stress in forest trees', *Chemosphere*, 36(4–5), pp. 757–762.

Godbout, A. C. and Fortin, J. A. (1983) 'Morphological Features of Synthesized Ectomycorrhizae of *Alnus crispa* and *A. rugosa*', *New Phytologist*, 94(2), pp. 249–262.

Hambleton, S. and Sigler, L. (2005) '*Meliniomyces*, a new anamorph genus for root-associated fungi with phylogenetic affinities to *Rhizoscyphus ericae* (≡ *Hymenoscyphus ericae*), *Leotiomyces*', *Studies in Mycology*, 53, pp. 1–27.

Hartley, J., Cairney, J. W. G. and Meharg, A. A. (1997) 'Do ectomycorrhizal fungi exhibit adaptive tolerance to potentially toxic metals in the environment?', *Plant and Soil*, 189(2), pp. 303–319.

Hibbs, D. E. and Cromack, K. (1990) 'Actinorhizal Plants in Pacific Northwest Forests', In Schwintzer, CR and Tjepkema (eds), *JD: The Biology of Frankia and Actinorhizal Plants*, Academic Press, London, pp. 343–363.

Hoagland, D. R. and Arnon, D. I. (1950) 'The water-culture method for growing plants without soil', *California Agricultural Experiment Station Circular*, 347(347), pp. 1–32.

Jentschke, G. and Godbold, D. L. (2000) 'Metal toxicity and ectomycorrhizas', *Physiologia Plantarum*, 109, pp. 107–116.

Jumpponen, A., Mattson, K. G. and Trappe, J. M. (1998) 'Mycorrhizal functioning of *Phialocephala fortinii* with *Pinus contorta* on glacier forefront soil : interactions with soil nitrogen and organic matter', *Mycorrhiza*, 7, pp. 261–265.

Jumpponen, A. and Trappe, J. M. (1998) 'Dark-septate root endophytes : a review with special reference to facultative biotrophic symbiosis', *New Phytologist*, 140, pp. 295–310.

Kabata-Pendias, A. and Pendias, H. (2001) *Trace elements in soils and plants*, Third Edition. Boca Raton: CRC Press.

Kennedy, P. G. and Hill, L. T. (2010) 'A molecular and phylogenetic analysis of the structure and specificity of *Alnus rubra* ectomycorrhizal assemblages', *Fungal Ecology*, 3(3), pp. 195–204.

Kennedy, P., Nguyen, N., Cohen, H., Peay, K. (2014) 'Missing checkerboards? An absence of competitive signal in *Alnus*-associated ectomycorrhizal fungal communities.' *PeerJ*, 2 (686). <https://doi.org/10.7717/peerj.686>

Peter G. Kennedy, Jennifer K.M. Walker and Laura M. Bogar. 2015. 'Interspecific mycorrhizal networks and non-networking hosts: Exploring the ecology of the host genus *Alnus*'. In T.R. Horton (ed.) *Mycorrhizal Networks*. Springer, pp. 227-254.

Khan, M. S., Zaidi, A., Wani, P. A. and Oves, M. (2009) 'Role of plant growth promoting rhizobacteria in the remediation of metal contaminated soils', *Environmental Chemistry Letters*, 7(1), pp. 1–19.

Krämer, U., Talke, I. N. and Hanikenne, M. (2007) 'Transition metal transport', *FEBS Letters*, 581(12), pp. 2263–2272.

Kuznetsova, T., Lukjanova, A., Mandre, M. and Lohmus, K. (2011) 'Aboveground biomass and nutrient accumulation dynamics in young black alder, silver birch and Scots pine plantations on reclaimed oil shale mining areas in Estonia', *Forest Ecology and Management*, 262(2), pp. 56–64.

Ledin, M. (2000) 'Accumulation of metals by microorganisms - processes and importance for soil systems', *Earth Science Reviews*, 51(1–4), pp. 1–31.

Likar, M. and Regvar, M. (2009) 'Application of temporal temperature gradient gel electrophoresis for characterisation of fungal endophyte communities of *Salix caprea* L. in a heavy metal polluted soil', *Science of the Total Environment*. Elsevier B.V., 407(24), pp. 6179–6187.

Likar, M. and Regvar, M. (2013) 'Isolates of dark septate endophytes reduce metal uptake and improve physiology of *Salix caprea* L.', *Plant and Soil*, 370(1–2), pp. 593–604.

Lorenc-Plucińska, G., Walentynowicz, M. and Niewiadomska, A. (2013) 'Capabilities of alders (*Alnus incana* and *A. glutinosa*) to grow in metal-contaminated soil', *Ecological Engineering*, 58, pp. 214–227.

Mandyam, K. and Jumpponen, A. (2005) 'Seeking the elusive function of the root-colonising dark septate endophytic fungi', *Studies in Mycology*, 53, pp. 173–189.

Mandyam, K., Loughin, T. and Jumpponen, A. (2010) 'Isolation and morphological and metabolic characterization of common endophytes in annually burned tallgrass...', *Mycologia*, 102 (4) (2010), pp. 813–821.

Markham, J. H. (2005) 'The effect of *Frankia* and *Paxillus involutus* on the performance of *Alnus incana* subsp. *rugosa* in mine tailings', *Canadian Journal of Botany*, 83(11), pp. 1384–1391.

Marx, D. H. (1969) 'The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistance of pine roots to pathogenic infections. I. Antagonism of mycorrhizal fungi to root pathogenic fungi and soil bacteria', *Phytopathology*, 59(2), pp. 153–163.

Massicotte, H. B., Melville, L. H., Peterson, R. L. and Unestam, T. (1999) 'Comparative studies of ectomycorrhiza formation in *Alnus glutinosa* and *Pinus resinosa* with *Paxillus involutus*', *Mycorrhiza*, 8(5), pp. 229–240.

- Mayerhofer, M. S., Kernaghan, G. and Harper, K. A. (2013) 'The effects of fungal root endophytes on plant growth: A meta-analysis', *Mycorrhiza*, 23(2), pp. 119–128
- MDDEP (2012) Directive 019 sur l'industrie minière. Ministère du Développement durable, de l'Environnement et des Parcs, Gouvernement du Québec. Available at: http://www.mddelcc.gouv.qc.ca/milieu_ind/directive019/directive019.pdf.
- Mohammadi-Bardbori, A. and Rannug, A. (2014) 'Arsenic, cadmium, mercury and nickel stimulate cell growth via NADPH oxidase activation', *Chemico-Biological Interactions*, 224, pp. 183–188.
- Molina, R. (1981) 'Ectomycorrhizal specificity in the genus *Alnus*', *Canadian Journal of Botany*, 59, pp. 325–334.
- Molina, R., Myrold, D. and Li, C. Y. (1994) 'Root symbiosis of red alder: Technological opportunities for enhanced regeneration and soil improvements', in Hibbs, D. E., Bell, D. S., and Tarant, R. F. (eds) *The Biology and Management of red alders*. Corvallis: Oregon State University Press, pp. 23–46.
- Molina, R. and Palmer, J. G. (1982) 'Isolation, maintenance and pure culture manipulation of ectomycorrhizal fungi', in Schenck, N. C. (ed.) *Methods and principles of Mycorrhizal research*. St. Paul: American Phytopathological Society, pp. 115–129.
- Monica, I. F. Della, Saparrat, M. C. N., Godeas, A. M. and Mart, J. (2015) 'The co-existence between DSE and AMF symbionts affects plant P pools through P mineralization and solubilization processes', *Fungal Ecology*, 17, pp. 10–17.
- Newsham, K. K. (1999) '*Phialophora graminicola*, a dark septate fungus, is a beneficial associate of the grass *Vulpia ciliata* ssp. *ambigua*', *New Phytologist*, 144(3), pp. 517–524.
- Newsham, K. K. (2011) 'A meta-analysis of plant responses to dark septate root endophytes', *New Phytologist*, 190(3), pp. 783–793.

Ngu, M., Moya, E. and Magan, N. (1998) 'Tolerance and uptake of cadmium, arsenic and lead by *Fusarium* pathogens of cereals', *International Biodeterioration and Biodegradation*, 42(1), pp. 55–62.

Oldroyd, G. E. D. (2013) 'Speak, friend, and enter: signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants', *Nature reviews, Microbiology*, 11(4), pp. 252–63.

Polme, S., Bahram, M., Yamanaka, T., Nara, K., Dai, Y. C., Grebenc, T., Kraigher, H., Toivonen, M., Wang, P. H., Matsuda, Y., Naadel, T., Kennedy, P. G., Koljalg, U. and Tedersoo, L. (2013) 'Biogeography of ectomycorrhizal fungi associated with alders (*Alnus* spp.) in relation to biotic and abiotic variables at the global scale', *New Phytologist*, 198(4), pp. 1239–1249.

Pourrut, B., Lopareva-Pohu, A., Pruvot, C., Garcon, G., Verdin, A., Waterlot, C., Bidar, G., Shirali, P. and Douay, F. (2011) 'Assessment of fly ash-aided phytostabilisation of highly contaminated soils after an 8-year field trial. Part 2. Influence on plants', *Science of the Total Environment*. Elsevier B.V., 409(21), pp. 4504–4510.

Rajkumar, M., Prasad, M. N. V., Swaminathan, S. and Freitas, H. (2012) 'Perspectives of plant-associated microbes in heavy metal phytoremediation', *Biotechnology advances*. Elsevier Ltd, 30(May), pp. 1562–1574.

Regvar, M., Likar, M., Piltaver, A., Kugonič, N. and Smith, J. E. (2010) 'Fungal community structure under goat willows (*Salix caprea* L.) growing at metal polluted site: The potential of screening in a model phytostabilisation study', *Plant and Soil*, 330(1), pp. 345–356.

Reininger, V., Grünig, C. R. and Sieber, T. N. (2012) 'Host species and strain combination determine growth reduction of spruce and birch seedlings colonized by root-associated dark septate endophytes', *Environmental Microbiology*, 14(4), pp. 1064–1076.

Roy, M., Rochet, J., Manzi, S., Jargeat, P., Gryta, H., Moreau, P. A. and Gardes, M. (2013) 'What determines *Alnus*-associated ectomycorrhizal community diversity and specificity? A comparison of host and habitat effects at a regional scale', *New Phytologist*, 198(4), pp. 1228–1238.

Roy, S., Khasa, D. P. and Greer, C. W. (2007) 'Combining alders, frankiae, and mycorrhizae for the revegetation and remediation of contaminated ecosystems', *Canadian Journal of Botany*, 85(3), pp. 237–251.

Schützendübel, A. and Polle, A. (2002) 'Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization', *Journal of experimental botany*, 53(372), pp. 1351–1365.

Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T. J., Karplus, K., Li, W., Lopez, R., McWilliam, H., Remmert, M., Söding, J., Thompson, J. D. and Higgins, D. G. (2011) 'Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega', *Molecular Systems Biology*, 7(539), pp. 1-6.

Stoyke, G. and Currah, R. S. (1993) 'Resynthesis in Pure Culture of a Common Subalpine Fungus-Root Association Using *Phialocephala fortinii* and *Menziesia ferruginea* (Ericaceae)', *Arctic and Alpine Research*, 25(3), pp. 189–193.

Tchounwou, P. B., Yedjou, C. G., Patlolla, A. K. and Sutton, D. J. (2012) 'Heavy metal toxicity and the environment', *National institutes of health*, 101, pp. 1–30.

Tedersoo, L., Suvi, T., Jairus, T. and Ostonen, I. (2009) 'Revisiting ectomycorrhizal fungi of the genus *Alnus*: differential host specificity, diversity and determinants of the fungal community', *New Phytologist*, 182, pp. 727–735.

Tellenbach, C., Grünig, C. R. and Sieber, T. N. (2011) 'Negative effects on survival and performance of Norway spruce seedlings colonized by dark septate root endophytes are primarily isolate-dependent', *Environmental Microbiology*, 13(9), pp. 2508–2517.

- Upson, R., Read, D. J. and Newsham, K. K. (2009) 'Nitrogen form influences the response of *Deschampsia antarctica* to dark septate root endophytes', *Mycorrhiza*, 20, pp. 1–11.
- Vierheilig, H., Coughlan, A. P., Wyss, U. R. S. and Recherche, C. De (1998) 'Ink and Vinegar, a Simple Staining Technique for Arbuscular-Mycorrhizal Fungi', *Applied and environmental microbiology*, 64(12), pp. 5004–5007.
- Vohn, M., Mrnka, L., Sov, T. L., Kohout, P. and Fehrer, J. (2013) 'The cultivable endophytic community of Norway spruce ectomycorrhizas from microhabitats lacking ericaceous hosts is dominated by ericoid mycorrhizal *Meliniomyces variabilis*', *Fungal Ecology*, 6, pp. 281-292.
- Vrålstad, T., Schumacher, T. and Taylor, A. F. S. (2002) 'Mycorrhizal synthesis between fungal strains of the *Hymenoscyphus ericae* aggregate and potential ectomycorrhizal and ericoid hosts', *New Phytologist*, 153(1), pp. 143–152
- Walker, J. K. M., Cohen, H., Higgins, L. M., Kennedy, P. G. and Kennedy, P. G. (2014) 'Testing the link between community structure and function for ectomycorrhizal fungi involved in a global tripartite symbiosis', *New Phytologist*, 202, pp. 287–296.
- White, T. J., Bruns, T. D., Lee, S. B. and Taylor, J. W. (1990) 'Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA Genes for Phylogenetics', in *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic press, pp. 315–322.
- Wilcox, H. E. and Wang, C. J. K. (1987) 'Mycorrhizal and pathological associations of dematiaceous fungi in roots of 7-month-old tree seedlings', *Canadian Journal of Forest Research.*, 17, pp. 884–899.
- Xu, R., Li, T., Cui, H., Wang, J., Yu, X., Ding, Y., Wang, C., Yang, Z. and Zhao, Z. (2015) 'Diversity and characterization of Cd-tolerant dark septate endophytes (DSEs) associated with the roots of Nepal alder (*Alnus nepalensis*) in a metal mine tailing of southwest China', *Applied Soil Ecology*, 93, pp. 11–18.

Yamada, A., Ogura, T., Degawa, Y. and Ohmasa, M. (2001) 'Isolation of *Tricholoma matsutake* and *T. bakamatsutake* cultures from field collected ectomycorrhizas', *Mycoscience*, 42, pp. 43–50.

Yu, T., Nassuth, A. and Peterson, R. (2001) 'Characterization of the interaction between the dark septate fungus *Phialocephala fortinii* and *Asparagus officinalis* roots', *Canadian journal of Microbiology*, 47 (2), pp. 741-753.

Zhang, Y., Li, T. and Zhao, Z. (2013) 'Colonization Characteristics and Composition of Dark Septate Endophytes (DSE) in a Lead and Zinc Slag Heap in Southwest China', *Soil and Sediment Contamination: An International Journal*, 22(5), pp. 532–545.

Appendix 1

Rank (median ratio) and interquartile range per strain in media amended with metals (pH 4.3) or at pH 2 without metals, all strains showing higher growth rates which are statistically different from the control ($P < 0.05$) are positioned at the left of the red bar, if applicable. Strains showing lower growth rates which are statistically different from the control ($P < 0.05$) are positioned at the right of the black bar, if applicable.

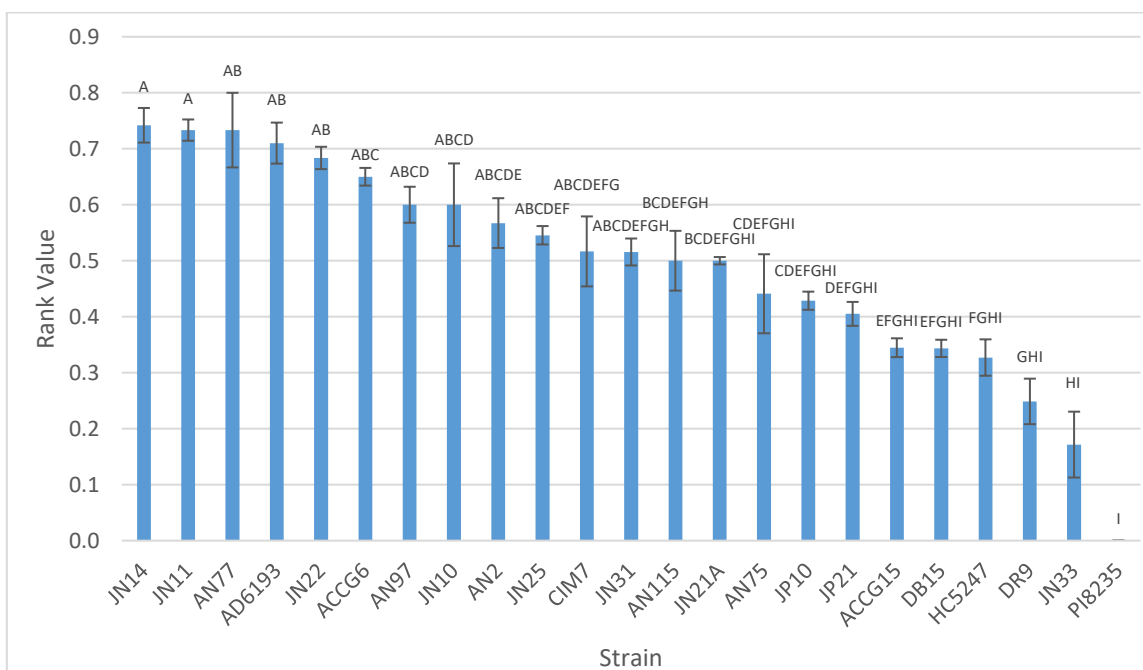


Fig. 4: Growth media amended with Cu^{2+} 150 ppm, pH 4.3

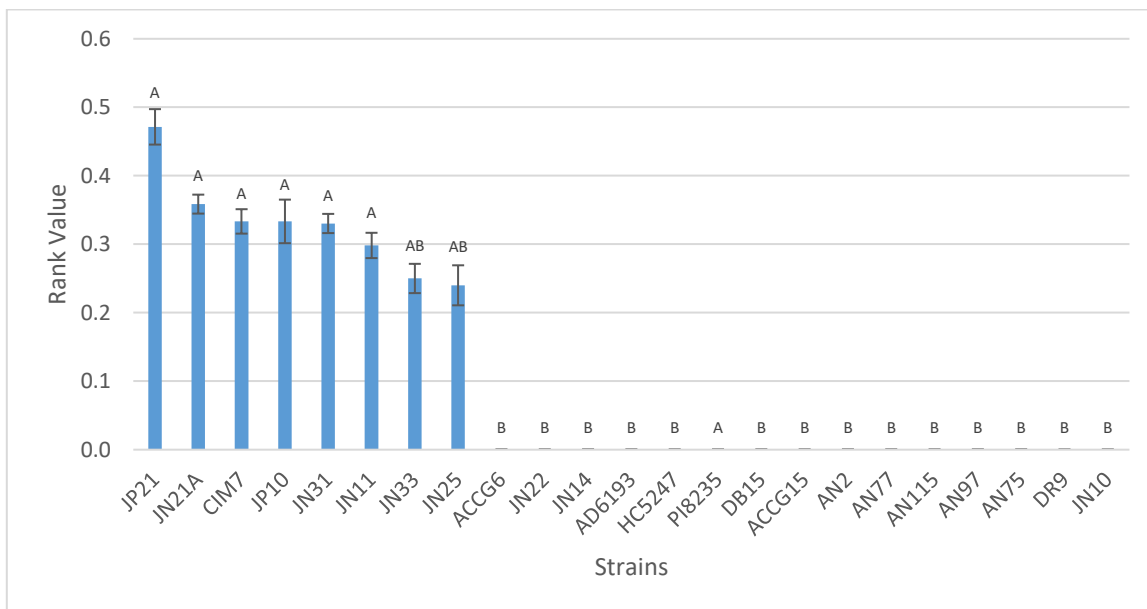


Fig. 5: Growth media amended with Ni^{2+} 50 ppm, pH 4.3

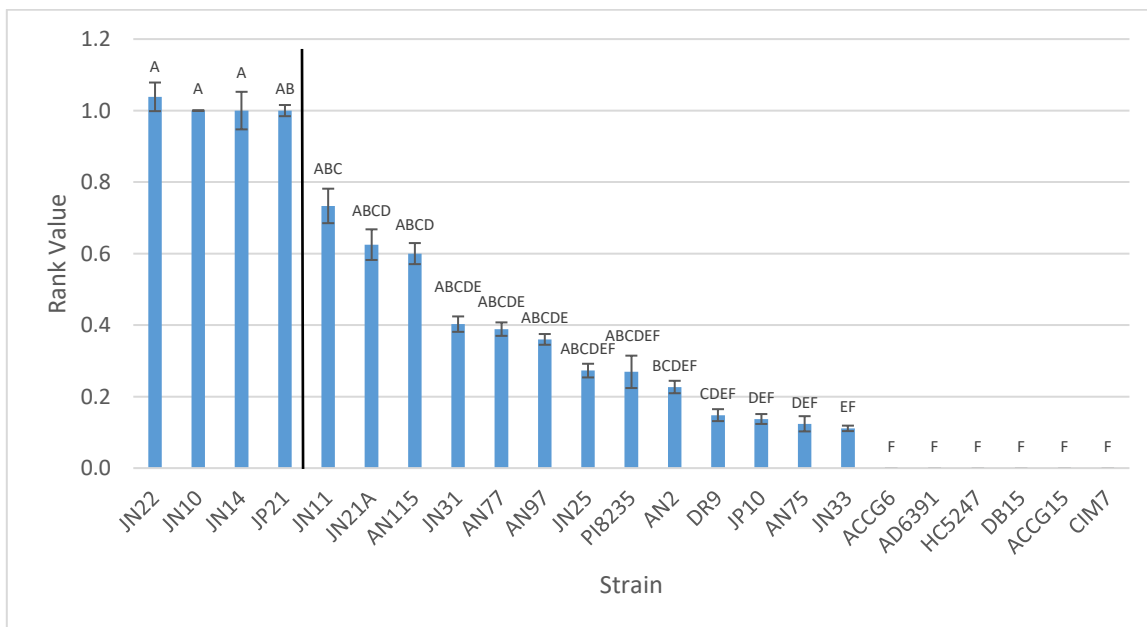


Fig. 6: Growth media amended with Zn^{2+} 225 ppm, pH 4.3

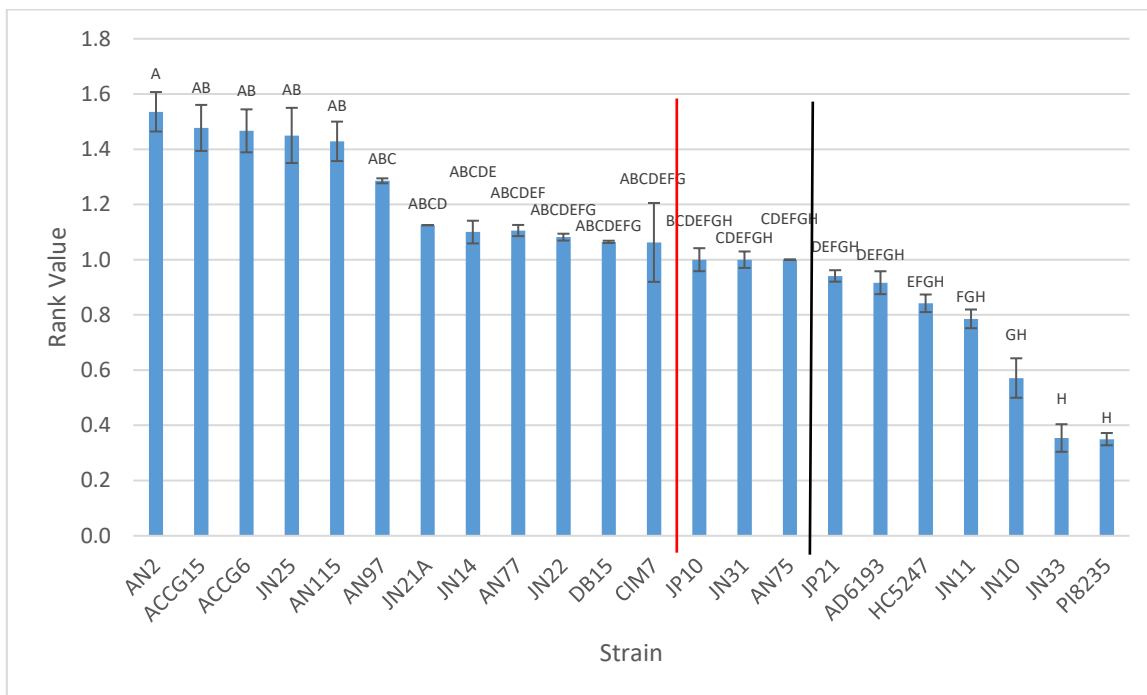


Fig. 7: Growth media amended with As^{3+} 50 ppm, pH 4.3

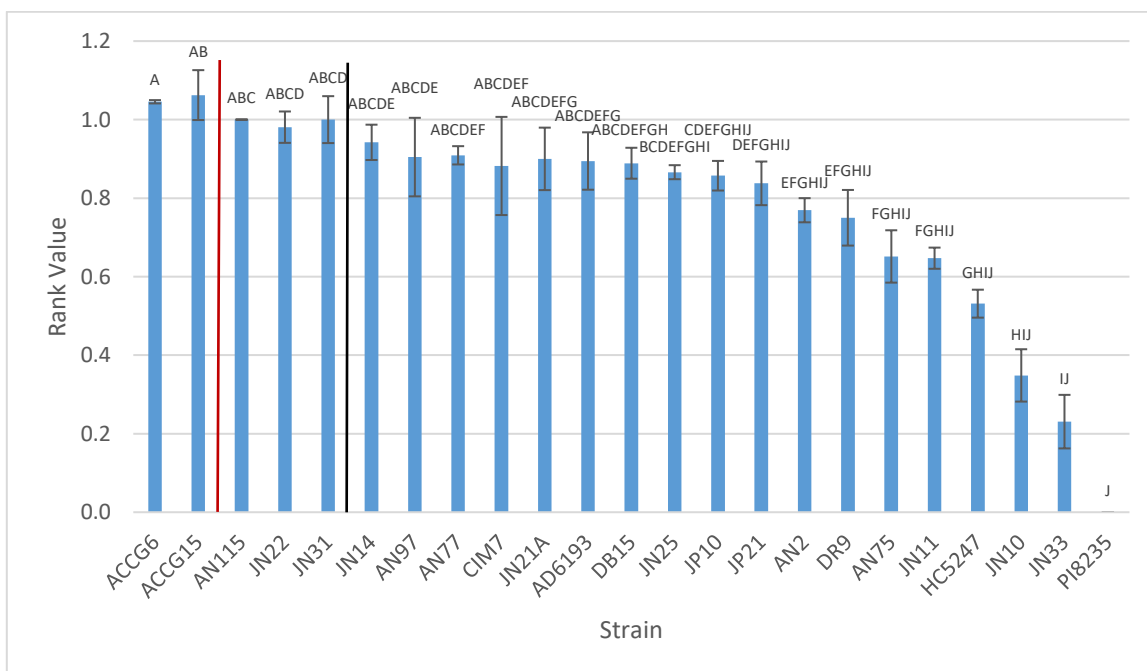


Fig. 8: Growth media amended with As^{3+} 150 ppm, pH 4.3

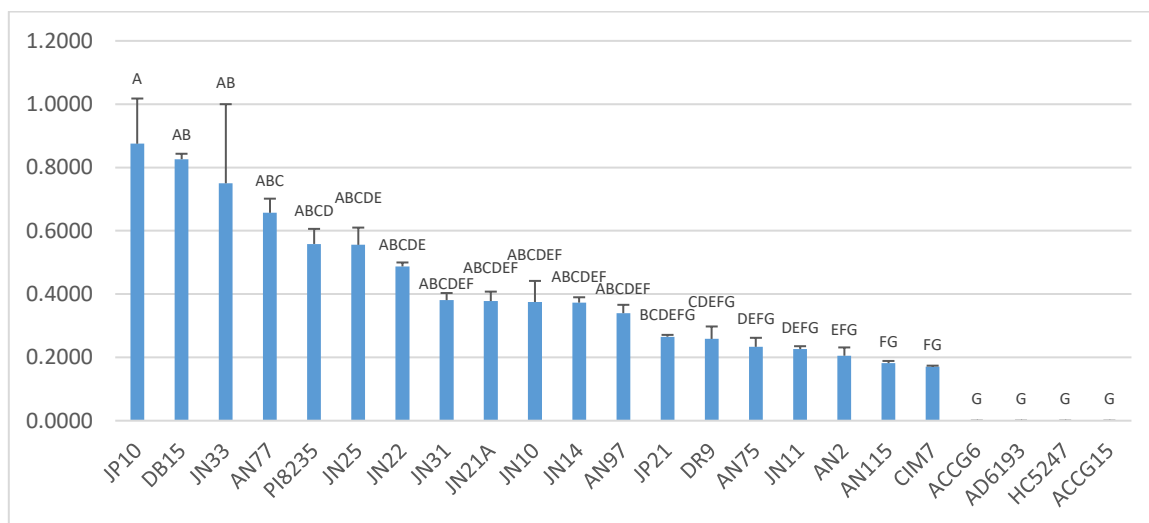


Fig. 9: Growth media at pH 2

CHAPITRE 3: ESSAIS DE CROISSANCE D'AULNES RUGUEUX ET CRISPÉS INOCULÉS.

Introduction

La caractérisation de la relation entre les champignons pseudomycorhiziens (DSE) et leurs plants hôtes a été le sujet de nombreuses études, cette relation variant de négative (Wilcox & Wang 1987; Stoyke & Currah 1993; Tellenbach *et al.* 2011; Reininger *et al.* 2012; Mayerhofer *et al.* 2013) à positive (Jumpponen & Trappe 1998; Newsham 1999; Upson *et al.* 2009; Newsham 2011). Suite à l'isolement d'endophytes fongiques et l'évaluation de leur tolérance à quatre métaux, un essai de croissance en milieu axénique a été effectué afin de d'entreprendre la définition de cette relation entre les souches isolées et l'AR ou AC. Cette étape est essentielle dans l'établissement du potentiel de ces souches comme inoculant, une relation négative pour la plante étant contraire à tout objectif de réhabilitation.

Deux composantes semblent au cœur de la définition de la relation entre les DSE et leur plants hôtes, soit la combinaison entre les espèces en cause et les conditions environnementales (Mandyam & Jumpponen 2005; Newsham 2011; Mayerhofer *et al.* 2013). À cet effet, Newsham (2011) dans sa méta-analyse a montré que les essais de croissance effectués en milieu non-définis et contenant de la matière organique affichaient des écarts de croissance plus importants que ceux effectués en milieux définis. Cette écart a été attribué à la capacité des DSE à dégrader des molécules organiques complexes, augmentant par le fait même la quantité de nutriments dans la rhizosphère (Jumpponen *et al.* 1998; Upson *et al.* 2009; Mandyam *et al.* 2010; Della Monica *et al.* 2015). Dans cette optique, notre essai de croissance a donc été réalisé en milieu organique non-défini.

Matériel et méthode

13 des 23 souches caractérisées pour leur tolérance aux métaux ont été testées pour déterminer leur impact sur la croissance de leur plant hôte, soit l'AR ou l'AC (la sélection de l'hôte ayant été déterminée par l'espèce sur laquelle le champignon a été isolé). Les souches ayant été isolées et n'ayant pas colonisé de racines lors d'expériences précédentes, visant la confirmation de leur statut d'endophyte, ont été écartées. De même, pour des considérations pratiques d'espace et de temps, lorsque plusieurs souches provenant d'un même site avaient des régions ITS quasi-identiques (99% et plus) une seule d'entre elles a été sélectionnée. Ainsi les souches JN10, JN14, AN2, AN75, AN77 et AN115 ont été exclues de l'essai. Le choix de la souche s'est tourné vers celle affichant les rangs les plus élevés en termes de résistance aux métaux (voir section précédente). Notons cependant que très peu de souches au sein d'un même groupe affichaient des différences statistiquement significatives.

Le protocole utilisé lors de cette expérience est le même que celui utilisé pour la validation du statut d'endophyte (voir matériel et méthode du chapitre précédent, « Validation of Endophytic Status »). Le substrat utilisé était « Mélange pour plants intérieurs Connaisseur » (Fafard, Bonnaventure, Qc; mousse de sphaigne, terre noire, perlite, sable, chaux dolomitique, fertilisant naturel). Le contenu en azote du substrat était de 0.35%, celui du phosphore disponible (P_2O_5) de 0.20% et celui du potassium (K_2O) de 0.15%. Le substrat contenait 25% de matière organique et possédait une humidité maximale (gravimétrique) de 55%. Chaque condition comptait 16 répliques. La période de croissance a été de 10 semaines.

Suite à cette période, les plants ont été récoltés et les racines lavées. Les tiges et les racines ont été mesurées avant d'être mises à sécher 72 heures à 70 °C. Les poids secs des tiges et racines de même que les poids sec totaux ont été pris. L'analyse statistique des résultats est la même que celle décrite dans la section matériel et méthodes « Metal/Metalloid and pH Tolerance » du chapitre précédent.

Résultats

Le rapport entre la masse sèche des tiges et la masse sèche des racines fut typiquement de 10 :1 aucune variation statistiquement significative n'apparaissant entre les différentes conditions (données non rapportées). La taille totale et la masse sèche totale étaient corrélées (0.62). Cependant, seules les mesures de masse sèches totales ont permis de recueillir des données affichant des variations statistiquement significatives entre les différentes conditions testées.

La figure 10 montre les rangs pour chaque condition testée. Seuls les plants inoculés à l'aide des souches AN97 et PI8235 ont eu des croissances significativement supérieures à leur témoin ($P=0.0079$ et 0.0239). Les plants inoculés à l'aide de la souche JP10 ont eu une croissance significativement inférieure à leur témoin ($P=0.0045$). Bien que les plants inoculés à l'aide des souches JN25 et Cim7 n'aient pas montrés de variations significatives avec leurs témoins, leurs taux de survie fut relativement bas, avec 6 et 13 morts. Ces taux de survie expliquent leur faible rang à la figure 10. Aucune variation significative n'est apparue entre les plants inoculés à l'aide d'ECM ou de DES (données non rapportées).

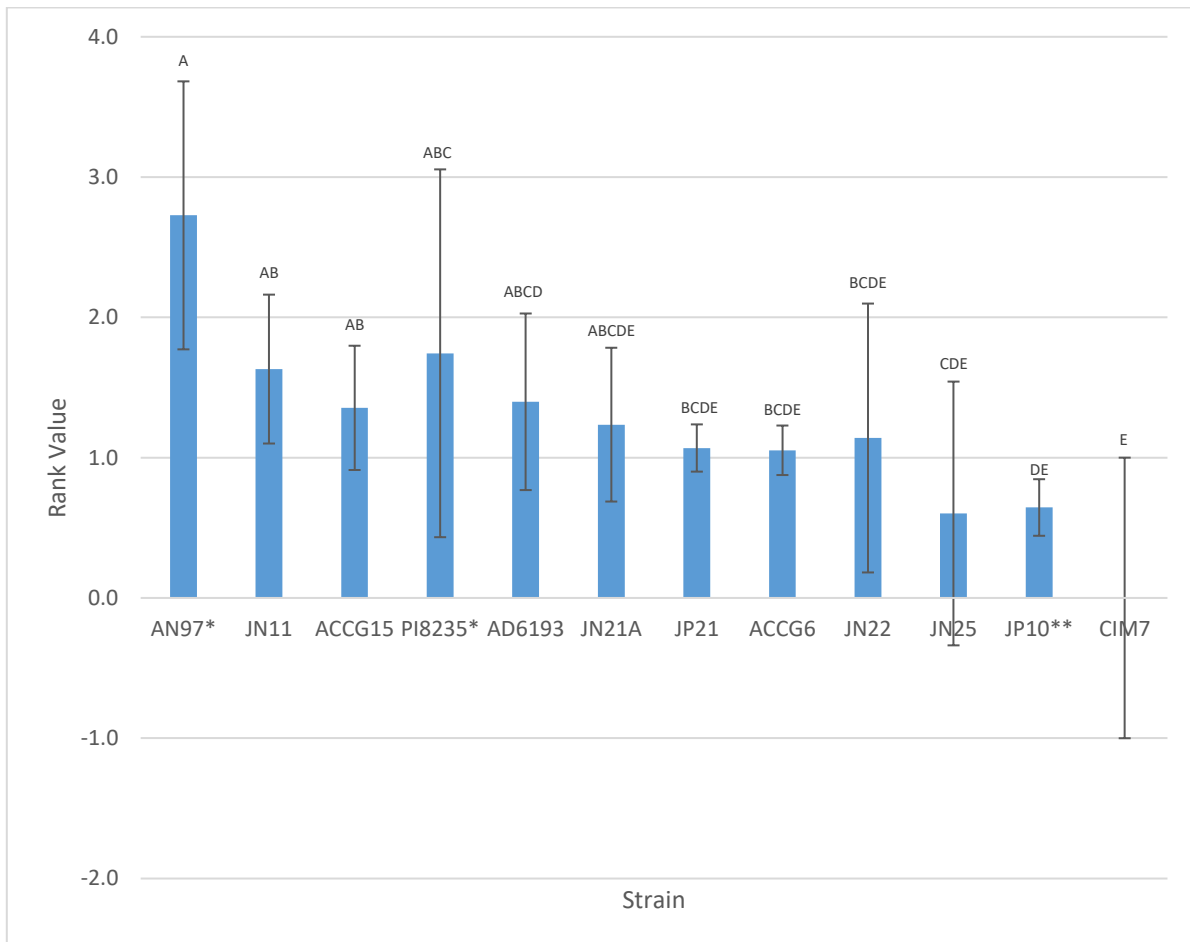


Figure 10 : Rang et écart interquartile par souche inoculée. L'ensemble des conditions ayant montrées des écarts significativement supérieurs au témoin sont marquées par * alors que ceux significativement inférieurs sont marquées par ** ($P < 0.05$).

Discussion

Cet essai de croissance se voulait une première évaluation de la relation entre les endophytes caractérisés pour leur tolérance aux métaux et leurs plants hôtes (AC ou AR). Peu de résultats significatifs ont été obtenus. Ceci semble principalement dû à la forte variation intraspécifique des conditions testées, l'écart type ayant été habituellement supérieur à 50% de la moyenne (données non rapportées).

Peu de conclusions peuvent être dérivées de cet essai en termes de sélection de souches pour des stratégies de phytostabilisation. En effet, les conditions environnementales affectant la relation entre les champignons endophytes et leurs plants hôtes (Mandyam & Jumpponen 2005; Newsham 2011; Mayerhofer *et al.* 2013), les effets observés en milieu organique et riche en nutriments ne sont pas garants de ce qui sera observé en milieu contaminé et pauvre. Ces essais demeuraient cependant essentiels, permettant de mieux différencier les effets dus au contaminant et ceux dus à l'endophyte lors d'essais subséquents en milieu contaminé. Cette expérience met également en évidence une forte variation intraspécifique et le besoin d'une grande quantité de réplicas lors de prochaines expériences.

CONCLUSION

Le développement de nouvelles techniques en réhabilitation des sols dégradés, telle la phytostabilisation, émerge du développement de connaissances plus fondamentales. Ainsi, l'objectif des études effectuées au cours de cette maîtrise était d'établir une partie des fondations nécessaires au développement de techniques de phytostabilisation à l'aide de l'aulne rugueux et de l'aulne crispé en ce qui a trait à certains métaux. Plus particulièrement, identifier les endophytes fongiques retrouvés sur les sites dégradés, caractériser leur tolérance à certains métaux et pH acides et finalement entreprendre la caractérisation de leur relation avec leurs plantes hôtes.

L'isolement d'endophytes fongiques a permis d'identifier une quinzaine de souches dont le statut endophytique a été confirmé. Contrairement à la majorité des endophytes ayant préalablement été identifiés dans la littérature, ces endophytes étaient en grande majorité des Ascomycètes de l'ordre des *Helotiales*. Leur présence chez l'aulne n'ayant été rapportée que dans une seule étude et leur relation avec l'aulne n'ayant à notre connaissance jamais été caractérisée, cette étude a permis d'ouvrir la voie à une meilleure compréhension de cette relation. Notamment, deux nouveaux genres (*Cryptosporiopsis* spp. et *Rhizocyphus* spp.) ont été identifiés pour la première fois comme endophyte de l'aulne.

La caractérisation de la tolérance aux métaux et à l'acidité des divers endophytes isolés a permis de déterminer leur tolérance relative à quatre métaux et trois pH acides et déterminer si certaines souches étaient plus tolérantes que d'autres. Cette caractérisation a représenté un défi du point de vue de la méthodologie et a mené au développement d'un nouveau protocole, simple d'utilisation et peu coûteux, permettant la caractérisation d'autres souches dans le futur. Les résultats de ces

essais ont montré qu'aucune souche ne représentait systématiquement une tolérance supérieure à tous les métaux, ce qui correspond à ce que la connaissance actuelle des mécanismes de tolérance chez les champignons permettait d'anticiper. Par contre, les résultats de ces essais laissent présager que certains taxons, ici celui des *Helotiales*, auraient des mécanismes de défense constitutifs qui leur donneraient une tolérance plus élevée et non spécifique aux métaux.

Les essais de tolérance à un contaminant particulier, l'arsenic, ont livré des résultats non attendus et d'intérêt scientifique général, sans pour autant être directement liés au sujet de cette étude. En effet, un nombre important de souches ont réagi favorablement à une faible quantité d'arsenic dans le milieu. Cette réaction était d'autant plus surprenante que l'arsenic, contrairement à d'autres métaux, ne joue aucun rôle biologique connu. Une révision en profondeur de la littérature nous a permis de constater que ces résultats n'étaient pas isolés et avait été observés dans d'autres études sans toutefois en être l'accent premier. Très peu de recherches, outre en ce qui a trait aux développements de cancers, l'arsenic étant un cancérigène connu, ont été effectuées sur les causes de ce phénomène. Ainsi, d'autres expériences sont nécessaires pour mieux comprendre les résultats observés.

Finalement, bien que les essais de croissance aient été limités, ils ont permis d'identifier certaines souches qui dans des circonstances particulières ont un effet néfaste sur leur hôte. Bien que le changement des conditions environnementales puisse changer la nature de la relation plante-endophyte, ces essais étaient nécessaires ne serait-ce que pour permettre de discerner dans de prochains essais l'impact de contaminants *versus* celui des endophytes. Les essais ont également permis d'identifier certaines souches qui stimulaient la croissance. Cependant, ces résultats ne sont pas indicatifs d'une relation à privilégier en milieu contaminé, où une croissance accélérée de la plante n'est pas toujours souhaitable.

Cette étude se voulait, somme toute, une première étape dans le développement de nouvelles techniques de phytostabilisation à l'aide de l'aulne. Ainsi, elle ouvre la voie à d'autres expériences permettant de poursuivre cet objectif.

Comme discuté précédemment, les conditions environnementales peuvent jouer un rôle clé dans la nature de la relation plante-pseudomycohyze en particulier et plante-endophyte en général. Des essais de croissance, utilisant les mêmes paramètres que ceux utilisés dans cette maîtrise, en milieu contaminé avec des métaux spécifiques seraient donc nécessaires pour déterminer quels sont les endophytes fongiques, parmi ceux identifiés, qui pourraient être avantageux pour l'aulne en milieu contaminé.

Suivant cette caractérisation, d'autres essais de croissance en milieu contaminé pourraient être faits avec des aulnes inoculés non seulement avec des champignons, mais également avec *Frankia sp.* Ce passage à des essais impliquant des relations tripartites est notamment possible puisque, tel que mentionné précédemment, plusieurs études ont déjà montré le rôle bénéfique de la relation *Frankia*-aulne en présence de métaux. Ces essais seraient d'autant plus pertinents que *Frankia sp.* est omniprésente chez l'aulne à l'état naturel.

Finalement, des études récentes ont mis en lumière la synergie possible d'endophytes fongiques de type mycorhiziens et pseudomycorhiziens pour l'acquisition de phosphore chez les plants hôtes. Le phosphore étant notamment requis chez *Frankia sp.* pour la fixation de l'azote atmosphérique, des essais de croissance en milieu non contaminé et contaminé impliquant diverses combinaisons

d'endophytes fongiques mycorhiziens et pseudomycorhiziens pourraient s'avérer pertinents.

BIBLIOGRAPHIE

Abernathy, C. O., Liu, Y. P., Longfellow, D., Aposhian, H. V, Beck, B., Fowler, B., Goyer, R., Menzer, R., Rossman, T., Thompson, C. and Waalkes, M. (1999) 'Arsenic: health effects, mechanisms of actions, and research issues.', *Environmental health perspectives*, 107(7), pp. 593–7.

Adriaensen, K., Van Der Lelie, D., Van Laere, A., Vangronsveld, J. and Colpaert, J. V. (2004) 'A zinc-adapted fungus protects pines from zinc stress', *New Phytologist*, 161(2), pp. 549–555.

Adriaensen, K., Vangronsveld, J. and Colpaert, J. V. (2006) 'Zinc-tolerant *Suillus bovinus* improves growth of Zn-exposed *Pinus sylvestris* seedlings', *Mycorrhiza*, 16(8), pp. 553–558.

Adriaensen, K., Vrålstad, T., Noben, J. P., Vangronsveld, J. and Colpaert, J. V. (2005) 'Copper-adapted *Suillus luteus*, a symbiotic solution for pines colonizing Cu mine spoils', *Applied and Environmental Microbiology*, 71(11), pp. 7279–7284.

Affholder, M. C., Pricop, A. D., Laffont-Schwob, I., Coulomb, B., Rabier, J., Borla, A., Demelas, C. and Prudent, P. (2014) 'As, Pb, Sb, and Zn transfer from soil to root of wild rosemary: Do native symbionts matter?', *Plant and Soil*, 382(1–2), pp. 219–236.

Ahasan, H. A. M. N., Chowdhury, M. A. J. and Azhar, M. (1994) 'Copper sulfate poisoning', *Tropical doctor*, 24(2), pp. 52–53.

Argüello, J. M., Eren, E. and González-Guerrero, M. (2007) 'The structure and function of heavy metal transport P_{1B}-ATPases', *BioMetals*, 20(3–4), pp. 233–248.

ATSDR (2007) Toxicological profile for arsenic. U.S. Department of Health and Public Services. Available at: <https://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp2.pdf>

- Babu, A. G., Kim, J. D. and Oh, B. T. (2013) 'Enhancement of heavy metal phytoremediation by *Alnus firma* with endophytic *Bacillus thuringiensis* GDB-1', Journal of Hazardous Materials. Elsevier B.V., 250–251, pp. 477–483.
- Ban, Y., Tang, M., Chen, H., Xu, Z., Zhang, H. and Yang, Y. (2012) 'The Response of Dark Septate Endophytes (DSE) to Heavy Metals in Pure Culture', PLoS ONE, 7(10), pp. 1-11.
- Barbafieri, M. (2000) 'The importance of nickel phytoavailable chemical species characterization in soil for phytoremediation applicability', International Journal of Phytoremediation, 2(2), pp. 105–115.
- Barbafieri, M., Japenga, J., Romkens, P. and Petruzzelli, G. (2013) 'Protocols for Applying Phytotechnologies in Metal-Contaminated Soils', Soil Biology, 35, pp. 19–38.
- Bataille, V. (2004) 'Genetic factors in nickel allergy', Journal of Investigative Dermatology. Elsevier Masson SAS, 123(6), pp. xxiv–xxv.
- Beaulieu, M. (2016) Guide d'intervention - Protection des sols et réhabilitation des terrains contaminés. Ministère du développement durable, de l'environnement et de la lutte aux changements climatiques. Available at: <http://www.mddelcc.gouv.qc.ca/sol/terrains/guide-intervention/>
- Bélanger, P-A., Bissonnette, C., Bernèche-D'Amours, A., Bellenger, J-P. and Roy, S. (2011) 'Assessing the adaptability of the actinorhizal symbiosis in the face of environmental change', Environmental and Experimental Botany, 74, pp. 98–105.
- Bélanger, P-A., Bellenger, J-P. and Roy, S. (2015) 'Heavy metal stress in alders : Tolerance and vulnerability of the actinorhizal symbiosis', Chemosphere, 138, pp. 300–308.

Bellion, M., Courbot, M., Jacob, C., Blaudez, D. and Chalot, M. (2006) 'Extracellular and cellular mechanisms sustaining metal tolerance in ectomycorrhizal fungi', FEMS Microbiological Letters, 254, pp. 173–181.

Berthelot, C., Blaudez, D. and Leyval, C. (2017) 'Differential growth promotion of poplar and birch inoculated with three dark septate endophytes in two trace element-contaminated soils', International Journal of Phytoremediation, 11(56), pp.1118-1125.

Berthelot, C., Leyval, C., Foulon, J., Chalot, M. and Blaudez, D. (2016) 'Plant growth promotion, metabolite production and metal tolerance of dark septate endophytes isolated from metal-polluted poplar phytomanagement sites', FEMS Microbiology Ecology, 92(10).

Beyersmann, D. and Hartwig, A. (2008) 'Carcinogenic metal compounds: Recent insight into molecular and cellular mechanisms', Archives of Toxicology, 82(8), pp. 493–512.

Bhatti, J. S., Foster, N. W., Hazlett, P. W., Forest, C., Box, S. P. O., Marie, S. S. and December, C. P. A. R. (1998) 'Fine root biomass and nutrient content in a black spruce peat soil with and without alder', Canadian Journal of Soil Science, 78, pp. 163–169.

Blaudez, D., Botton, B. and Chalot, M. (2000) 'Cadmium uptake and subcellular compartmentation in the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus*', Microbiology, 146(2000), pp. 1109–1117.

Blaudez, D., Jacob, C., Turnau, K., Colpaert, J. V, Finlay, R., Botton, B. and Chalot, M. (2000) 'Differential responses of ectomycorrhizal fungi to heavy metals *in vitro*', Mycological Research, 104(11), pp. 1366–1371.

Bolan, N. S., Adriano, D. C., Duraisamy, P., Mani, A. and Arulmozhiselvan, K. (2003) 'Immobilization and phytoavailability of cadmium in variable charge soils-1: Effect of phosphate addition', Plant and Soil, 250(1), pp. 187–198.

- Bolan, N. S., Park, J. H., Robinson, B., Naidu, R. and Huh, K. Y. (2011) 'Phytostabilization: A Green Approach to Contaminant Containment', *Advances in Agronomy*, 112, pp. 145–204.
- Boysen, M., Solberg, L. A., Andersen, I., Høgetveit, A. C. and Torjussen, W. (1982) 'Nasal histology and nickel concentration in plasma and urine after improvements in the work environment at a nickel refinery in Norway', *Scandinavian Journal of Work, Environment and Health*, 8(4), pp. 283–289.
- Brady, N. C. and Weil, R. R. (2008) *The Nature and Properties of soil*. 14th edn. Upper Saddle River: Pearson.
- Brouillet, L., Coursol, F., Meades, S. J., Favreau, M., Anions, M., Bélisle, P. and Desmet, P. (2010) VASCAN, the Database of Vascular Plants of Canada. Available at: <http://data.canadensys.net/vascan> (Accessed: 23 October 2017).
- Brown, P. H., Welch, R. M. and Cary, E. E. (1987) 'Nickel : A Micronutrient Essential for Higher Plants', *Plant physiology*, 85, pp. 801–803.
- Carrillo-Gonzalez, R., Gonzalez-Chavez, M. C., Wright, S. F. and Nichols, K. A. (2004) 'The role of glomalin, a protein produced by arbuscular mycorrhizal fungi, in sequestering potentially toxic elements', *Environmental pollution*, 130, pp. 317–323.
- Chaia, E. E., Wall, L. G. and Huss-Danell, K. (2010) 'Life in soil by the actinorhizal root nodule endophyte *Frankia*. A review', *Symbiosis*, 51(3), pp. 201–226.
- Chen, Z. and Li, J. (2004) 'Phylogenetics and biogeography of *Alnus* (*Betulaceae*) inferred from sequences of nuclear ribosomal DNA ITS region', *International Journal of Plant Science*, 165(2), pp. 325–335.
- Claessens, H., Oosterbaan, A., Savill, P. and Rondeux, J. (2010) 'A review of the characteristics of black alder (*Alnus glutinosa* (L.) Gaertn.) and their implications for silvicultural practices', *Forestry*, 83(2), pp. 163–175.

Clothier, B. E., Green, S. R., Robinson, B. H., Thayalakumaran, T., Scotter, D. R., Vogeler, I., Mills, T. M., Deurer, M., van der Velde, M. and Granel, T. (2008) 'Contaminants in the rootzone: Bioavailability, uptake and transport, and their implications for remediation', in Naidu, R. (ed.) *Developments in Soil Science*. Elsevier B. V., pp. 633–655.

Colpaert, J. V (2008) 'Heavy metal pollution and genetic adaptations in ectomycorrhizal fungi', *Stress in Yeasts and Filamentous Fungi*, pp. 157–173.

Colpaert, J. V., Muller, L. A. H., Lambaerts, M., Adriaensen, K. and Vangronsveld, J. (2004) 'Evolutionary adaptation to Zn toxicity in populations of Suilloid fungi', *New Phytologist*, 162(2), pp. 549–559.

Colpaert, J. V., Wevers, J. H. L., Krzmaric, E. and Adriaensen, K. (2011) 'How metal-tolerant ecotypes of ectomycorrhizal fungi protect plants from heavy metal pollution', *Annals of Forest Science*, 68(1), pp. 17–24.

Corrêa, A. and Martins-Louçao, M.-A. (2011) 'C:N Interactions and the Cost: Benefit Balance in Ectomycorrhizae', in Rai, M. and Varma, A. (eds) *Diversity and Biotechnology of Ectomycorrhizae*. Berlin: Springer, pp. 387–403.

Dawson, J. O. (2008) 'Ecology of Actinorhizal Plants', in Pawlowski, K. and Newton, W. E. (eds) *Nitrogen-fixing Actinorhizal Symbioses*. Springer, pp. 199–234.

Dhankhar, R. and Hooda, A. (2011) 'Fungal biosorption – an alternative to meet the challenges of heavy metal pollution in aqueous solutions', *Environmental technology*, 32(5), pp. 467–491.

Dickinson, N. M. (2000) 'Strategies for sustainable woodland on contaminated soils', *Chemosphere*, 41(1–2), pp. 259–263.

Diem, H. G. (1996) 'Les mycorhizes des plantes actinorhiziennes', *Acta Botanica Gallica*, 143(7), pp. 581–592.

- Egertonwarburton, L. M. and Griffin, B. J. (1995) 'Differential Responses of *Pisolithus tinctorius* Isolates to Aluminum *in-vitro*', Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne De Botanique, 73, pp. 1229–1233.
- Ellingsen, G. D., Horn, N. and Aaseth, J. (2007) 'Copper', in Nordberg, G., Fowler, B., and Nordberg, M. (eds) Handbook on the toxicology of metals, third edition. Elsevier, pp. 529–546.
- Fowler, B. A., Chou, C.-H. S. J., Jones, R. L. and Chen, C.-J. (2007) 'Arsenic', in Nordberg, G., Fowler, B., and Nordberg, M. (eds) Handbook on the toxicology of metals, third edition. Elsevier, pp. 367–406.
- Garbaye, J. (2013) La symbiose mycorhizienne: Une association entre les plantes et les champignons, Éditions Quae, Versailles, pp. 1-280.
- Godbold, D. L., Jentschke, G., Winter, S. and Marschner, P. (1998) 'Ectomycorrhizas and amelioration of metal stress in forest trees', Chemosphere, 36(4–5), pp. 757–762.
- Godbout, A. C. and Fortin, J. A. (1983) 'Morphological Features of Synthesized Ectomycorrhizae of *Alnus crispa* and *A. rugosa*', New Phytologist, 94(2), pp. 249–262.
- González-Guerrero, M., Escudero, V., Saéz, Á. and Tejada-Jiménez, M. (2016) 'Transition Metal Transport in Plants and Associated Endosymbionts: Arbuscular Mycorrhizal Fungi and Rhizobia', Frontiers in Plant Science, 7(July), pp. 1–21.
- Gouvernement du Québec (2017) Règlement sur la protection et la réhabilitation des terrains, chapitre Q-2, r. 37. Available at: <http://legisquebec.gouv.qc.ca/fr/pdf/cr/Q-2, R. 37.pdf>.
- Goyer, R. A. (2001) 'Toxic effect of metals', in Cassarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons. New York: McGraw-Hill Publisher, pp. 811–867.
- Guerinot, M. Lou (2000) 'The ZIP family of metal transporters', Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes, 1465(1–2), pp. 190–198.

Hartley, J., Cairney, J. W. G. and Meharg, A. A. (1997) 'Do ectomycorrhizal fungi exhibit adaptive tolerance to potentially toxic metals in the environment?', *Plant and Soil*, 189(2), pp. 303–319.

Hébert, J. and Bernard, J. (2013) Bilan sur la gestion des terrains contaminés au 31 décembre 2010. Ministère du Développement durable, de l'Environnement, de la Faune et des Parcs, Gouvernement du Québec. Available at : <http://www.mddelcc.gouv.qc.ca/sol/terrains/bilan/bilan2010.pdf>

Helbig, K., Bleuel, C., Krauss, G. J. and Nies, D. H. (2008) 'Glutathione and transition-metal homeostasis in *Escherichia coli*', *Journal of Bacteriology*, 190(15), pp. 5431–5438.

Helm, D. J., Allen, E. B. and Trappe, J. M. (1996) 'Mycorrhizal chronosequence near Exit Glacier, Alaska', *Canadian Journal of Botany*, 74(9), pp. 1496–1506.

Herbst, M., Eschenbach, C. and Kappen, L. (1999) 'Water use in neighbouring stands of beech (*Fagus sylvatica* L.) and black alder (*Alnus glutinosa* (L.) Gaertn.)', *Annals of Forest Science*, 56, pp. 107–120.

Hetrick, B. A. D., Wilson, G. W. T. and Figge, D. A. H. (1994) 'The influence of mycorrhizal symbiosis and fertilizer amendments on establishment of vegetation in heavy metal mine spoil', *Environmental Pollution*, 86(2), pp. 171–179.

Huang, P. M. (2004) 'Soil Mineral–Organic Matter–Microorganism Interactions: Fundamentals And Impacts', *Advances in Agronomy*, pp. 391–472

Hughes, M. F. (2002) 'Arsenic toxicity and potential mechanisms of action', *Toxicology Letters*, 133, pp. 1–16.

Hurd, T. M., Raynal, D. J. and Schwintzer, C. R. (2001) 'Symbiotic N₂ fixation of *Alnus incana* ssp. *rugosa* in shrub wetlands of the Adirondack Mountains, New York, USA', *Oecologia*, 126(1), pp. 94–103.

Huss-Danell, K. (1997) 'Tansley Review No. 93 Actinorhizal symbioses and their N₂ fixation', *New Phytologist*, 136(93), pp. 375–405.

International Agency for Research on Cancer (1990) IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans. Lyon: World Health Organization.

Jourand, P., Ducouso, M., Loulergue-Majorel, C., Hannibal, L., Santoni, S., Prin, Y. and Lebrun, M. (2010) 'Ultramafic soils from New Caledonia structure *Pisolithus albus* in ecotype', *FEMS Microbiology Ecology*, 72(2), pp. 238–249.

Jumpponen, A. (2001) 'Dark septate endophytes - Are they mycorrhizal?', *Mycorrhiza*, 11(4), pp. 207–211.

Jumpponen, A. and Trappe, J. M. (1998) 'Dark-septate root endophytes : a review with special reference to facultative biotrophic symbiosis', *New Phytologist*, 140, pp. 295–310.

Kennedy, P. G. and Hill, L. T. (2010) 'A molecular and phylogenetic analysis of the structure and specificity of *Alnus rubra* ectomycorrhizal assemblages', *Fungal Ecology*, 3(3), pp. 195–204.

Khan, M. S., Zaidi, A., Wani, P. A. and Oves, M. (2009) 'Role of plant growth promoting rhizobacteria in the remediation of metal contaminated soils', *Environmental Chemistry Letters*, 7(1), pp. 1–19.

Klein, C. and Costa, M. (2007) 'Nickel', in Nordberg, G., Fowler, B., and Nordberg, M. (eds) *Handbook on the toxicology of metals*, third edition. Elsevier, pp. 743–758.

Krpata, D., Peintner, U., Langer, I., Fitz, W. J. and Schweiger, P. (2008) 'Ectomycorrhizal communities associated with *Populus tremula* growing on a heavy metal contaminated site', *Mycological Research*, 112(9), pp. 1069–1079.

Krznaric, E., Verbruggen, N., Wevers, J. H. L., Carleer, R., Vangronsveld, J. and Colpaert, J. V. (2009) 'Cd-tolerant *Suillus luteus*: A fungal insurance for pines exposed to Cd', *Environmental Pollution*. Elsevier Ltd, 157(5), pp. 1581–1588.

Kuznetsova, T., Lukjanova, A., Mandre, M. and Lohmus, K. (2011) 'Aboveground biomass and nutrient accumulation dynamics in young black alder, silver birch and Scots pine plantations on reclaimed oil shale mining areas in Estonia', *Forest Ecology and Management*, 262(2), pp. 56–64.

Kuznetsova, T., Rosenvald, K., Ostonen, I., Helmisaari, H.-S., Mandre, M. and Lõhmus, K. (2010) 'Survival of black alder (*Alnus glutinosa* L.), silver birch (*Betula pendula* Roth.) and Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) seedlings in a reclaimed oil shale mining area', *Ecological Engineering*, 36(4), pp. 495–502.

Landeweert, R., Hoffland, E., Finlay, R. D., Kuyper, T. W., Breemen, N. Van and Finlay, R. D. (2001) 'Linking plants to rocks : ectomycorrhizal fungi mobilize nutrients from minerals', *TRENDS in Ecology and Evolution*, 16(5), pp. 248–254.

Latunde-Dada, G. O., Shirali, S., McKie, A. T., Simpson, R. J. and Peters, T. J. (2004) 'Effect of transition metal ions (cobalt and nickel chlorides) on intestinal iron absorption', *European Journal of Clinical Investigation*, 34(9), pp. 626–630.

Ledin, M. (2000) 'Accumulation of metals by microorganisms - processes and importance for soil systems', *Earth Science Reviews*, 51(1–4), pp. 1–31.

Li, T., Liu, M. J., Zhang, X. T., Zhang, H. B., Sha, T. and Zhao, Z. W. (2011) 'Improved tolerance of maize (*Zea mays* L.) to heavy metals by colonization of a dark septate endophyte (DSE) *Exophiala pisciphila*', *Science of the Total Environment*, 409(6), pp. 1069–1074.

Liden, C., Wahlberg, J. E. and Maibach, H. I. (1995) 'Skin', in Goyer R A, Klaussen C D, W. M. P. (ed.) *Metal Toxicology*. London: Academic Press, p. 447.

Likar, M. and Regvar, M. (2009) 'Application of temporal temperature gradient gel electrophoresis for characterisation of fungal endophyte communities of *Salix caprea* L. in a heavy metal polluted soil', *Science of the Total Environment*. Elsevier B.V., 407(24), pp. 6179–6187.

- Likar, M. and Regvar, M. (2013) 'Isolates of dark septate endophytes reduce metal uptake and improve physiology of *Salix caprea* L.', *Plant and Soil*, 370(1–2), pp. 593–604.
- Liu, J., Seiichi, K., Hara, K. and Zhang, G. (2001) 'Death Following Cupric Sulfate Emesis', *Journal of toxicology*, 39(2), pp. 161–163.
- Lorenc-Plucińska, G., Walentynowicz, M. and Niewiadomska, A. (2013) 'Capabilities of alders (*Alnus incana* and *A. glutinosa*) to grow in metal-contaminated soil', *Ecological Engineering*, 58, pp. 214–227.
- Luo, Z. Bin, Wu, C., Zhang, C., Li, H., Lipka, U. and Polle, A. (2014) 'The role of ectomycorrhizas in heavy metal stress tolerance of host plants', *Environmental and Experimental Botany*. Elsevier B.V., 108, pp. 47–62.
- Mahboob, H., Richeson III, R. and McCain, R. (2017) 'Zinc Chloride Smoke Inhalation Induced Severe Acute Respiratory Distress Syndrome: First Survival in the United States with Extended Duration (Five Weeks) Therapy with High Dose Corticosteroids in Combination with Lung Protective Ventilation', *Case Reports in Critical Care*, 2017, pp. 1–8.
- Mandyam, K. and Jumpponen, A. (2005) 'Seeking the elusive function of the root-colonising dark septate endophytic fungi', *Studies in Mycology*. 53, pp. 173–189.
- Mandyam, K., Loughin, T. and Jumpponen, A. (2010) 'Isolation and morphological and metabolic characterization of common endophytes in annually burned tallgrass...', *Mycologia*, 102 (4)(2010), pp. 813–821.
- Markham, J. H. (2005) 'The effect of *Frankia* and *Paxillus involutus* on the performance of *Alnus incana* subsp. *rugosa* in mine tailings', *Canadian Journal of Botany*, 83(11), pp. 1384–1391.
- Mayerhofer, M. S., Kernaghan, G. and Harper, K. A. (2013) 'The effects of fungal root endophytes on plant growth: A meta-analysis', *Mycorrhiza*, 23(2), pp. 119–128.

McKinney, P. E., Brent, J. and Kulig, K. (1994) 'Acute Zinc Chloride Ingestion in a Child: Local and Systemic Effects', *Annals of Emergency Medicine*, 23(6), pp. 1383–1387.

Meena, M. C. and Bansal, M. K. (2014) 'Acute Copper Sulfate Poisoning : Case Report and Review of Literature', (August), pp. 130–133.

Mertens, J., Vervaeke, P., De Schrijver, A. and Luyssaert, S. (2004) 'Metal uptake by young trees from dredged brackish sediment: Limitations and possibilities for phytoextraction and phytostabilisation', *Science of the Total Environment*, 326(1–3), pp. 209–215.

Miller, J. R. and Miller, S. M. O. (2007) 'Contaminated rivers: A geomorphological-geochemical approach to site assessment and remediation', Springer, pp. 1-418.

Ministère du développement durable, de l'environnement et de la lutte contre les changements climatiques (2017) 'Politique de protection des sols et de réhabilitation des terrains contaminés, plan d'action 2017-2021', Gouvernement du Québec. Available at : <http://www.mddelcc.gouv.qc.ca/sol/terrains/politique/politique.pdf>

Molina, R. (1981) 'Ectomycorrhizal specificity in the genus *Alnus*', *Canadian Journal of Botany*, 59, pp. 325–334.

Molina, R., Massicotte, H. B. and Trappe, J. (1992) 'Specificity phenomena in mycorrhizal symbioses : Community- ecological consequences and practical implications', in Allen, M. F. (ed.) *Mycorrhizal Functioning: An Integrative Plant-Fungal Process*. London: Chapman and Hall, pp. 357–423.

Molina, R., Myrold, D. and Li, C. Y. (1994) 'Root symbiosis of red alder: Technological opportunities for enhanced regeneration and soil improvements', in Hibbs, D. E., Bell, D. S., and Tarant, R. F. (eds) *The Biology and Management of red alders*. Corvallis: Oregon State University Press, pp. 23–46.

- Monica, I. F. Della, Saparrat, M. C. N., Godeas, A. M. and Mart, J. (2015) 'The co-existence between DSE and AMF symbionts affects plant P pools through P mineralization and solubilization processes', *Fungal Ecology*, 17, pp. 10–17.
- Monzón, A. and Azcón, R. (2001) 'Growth responses and N and P use efficiency of three *Alnus* species as affected by arbuscular-mycorrhizal colonisation', *Plant Growth Regulation*, 35(1), pp. 97–104.
- Mortazavi, F. and Javid, A. J. (2009) 'Acute Renal Failure due to Copper Sulfate Poisoning : a Case Report', *Iran Journal of Pediatrics*, 19(1), pp. 75–78.
- Moser, A. M., Frank, J. L., D'Allura, J. A. and Southworth, D. (2009) 'Ectomycorrhizal communities of *Quercus garryana* are similar on serpentine and nonserpentine soils', *Plant and Soil*, 315(1–2), pp. 185–194.
- Myrold, D. D. and Huss-Danell, K. (2003) 'Alder and lupine enhance nitrogen cycling in a degraded forest soil in Northern Sweden', *Plant and Soil*, 254(1), pp. 47–56.
- Nevo, Y. and Nelson, N. (2006) 'The NRAMP family of metal-ion transporters', *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1763(7), pp. 609–620.
- Newsham, K. K. (2011) 'A meta-analysis of plant responses to dark septate root endophytes', *New Phytologist*, 190(3), pp. 783–793.
- Nordberg, G., Fowler, B. and Nordberg, M. (2007) *Handbook on the Toxicology of Metals*, Third Edition. Edited by G. Nordberg, B. Fowler, and M. Nordberg. Elsevier.
- Polme, S., Bahram, M., Yamanaka, T., Nara, K., Dai, Y. C., Grebenc, T., Kraigher, H., Toivonen, M., Wang, P. H., Matsuda, Y., Naadel, T., Kennedy, P. G., Koljalg, U. and Tedersoo, L. (2013) 'Biogeography of ectomycorrhizal fungi associated with alders (*Alnus* spp.) in relation to biotic and abiotic variables at the global scale', *New Phytologist*, 198(4), pp. 1239–1249.
- Pourrut, B., Lopareva-Pohu, A., Pruvot, C., Garcon, G., Verdin, A., Waterlot, C., Bidar, G., Shirali, P. and Douay, F. (2011) 'Assessment of fly ash-aided

phytostabilisation of highly contaminated soils after an 8-year field trial. Part 2. Influence on plants', *Science of the Total Environment*. Elsevier B.V., 409(21), pp. 4504–4510.

Raven, P. H., Evert, R. F. and Eichhorn, S. E. (2000) *Biologie Végétale*. Paris: De Boek Université.

Regvar, M., Likar, M., Piltaver, A., Kugonič, N. and Smith, J. E. (2010) 'Fungal community structure under goat willows (*Salix caprea* L.) growing at metal polluted site: The potential of screening in a model phytostabilisation study', *Plant and Soil*, 330(1), pp. 345–356.

Reid, R. and Hayes, J. (2003) 'Mechanisms and control of nutrient uptake in plants', *International Review of Cytology*, 229, pp. 73–114.

Ressources naturelles Canada (2015) Aulne tendre. Available at: <https://aimfc.rncan.gc.ca/fr/arbres/fiche/399> (Accessed: 23 October 2017).

Roy, M., Rochet, J., Manzi, S., Jargeat, P., Gryta, H., Moreau, P. A. and Gardes, M. (2013) 'What determines *Alnus*-associated ectomycorrhizal community diversity and specificity? A comparison of host and habitat effects at a regional scale', *New Phytologist*, 198(4), pp. 1228–1238.

Roy, S., Khasa, D. P. and Greer, C. W. (2007) 'Combining alders, frankiae, and mycorrhizae for the revegetation and remediation of contaminated ecosystems', *Canadian Journal of Botany*, 85(3), pp. 237–251.

Ruotsalainen, A. L., Markkola, A. M. and Kozlov, M. V. (2009) 'Mycorrhizal colonisation of mountain birch (*Betula pubescens* ssp. *czerepanovii*) along three environmental gradients: Does life in harsh environments alter plant-fungal relationships?', *Environmental Monitoring and Assessment*, 148(1–4), pp. 215–232.

Sandstead, H. H. (1995) 'Requirements and toxicity of essential trace elements, illustrated by zinc and copper', *American Journal of Clinical Nutrition*, 61(3 SUPPL.), pp. 621-624.

Schwencke, J. and Carú, M. (2001) 'Advances in Actinorhizal Symbiosis: Host Plant-*Frankia* Interactions, Biology, and Applications in Arid Land Reclamation. A Review', *Arid Land Research and Management*, 15(4), pp. 285–327.

Schwintzer, C. R. and Tjepkema, J. D. (1990) *The Biology of Frankia and Actinorhizal Plants*. San Diego: Academic Press.

Scott, L. K., Grier, L. R., Arnold, T. C. and Conrad, S. A. (2002) 'Respiratory Failure From Inhalational Nickel', *Inhalation toxicology*, 14, pp. 1103–1109.

Semple, K. T., Doick, K. J., Jones, K. C., Buraue, P., Craven, A. and Harms, H. (2004) 'Defining Bioavailability and Bioaccessibility of Contaminated Soil and Sediment is Complicated', *Environmental Science & Technology*, 38(12), p. 228A–231A.

Standstead, H. H. and Au, W. (2007) 'Zinc', in Nordberg, G., Fowler, B., and Nordberg, M. (eds) *Handbook on the toxicology of metals*, third edition. Elsevier, pp. 925–947.

Stangl, G. and Kirchgessner, M. (1996) 'Nickel deficiency alters liver lipid metabolism in rats', *Journal of nutrition*, 126(10), pp. 2466–2473.

Stradberg, G. W., Shumate, S. E. and Parrott, J. R. (1981) 'Microbial Cells as Biosorbents for Heavy Metals : Accumulation of Uranium by *Saccharomyces cerevisiae* and *Pseudomonas aeruginosa*', *Applied and environmental microbiology*, 41(1), pp. 237–245.

Sunderman, W. F., Reid, M. C., Bibeau, L. M. and Linden, J. V (1983) 'Nickel Induction of Microsomal Heme Oxygenase Activity in Rodents', *Toxicology and Applied Pharmacology*, 68, pp. 87–95.

- Tchounwou, P. B., Yedjou, C. G., Patlolla, A. K. and Sutton, D. J. (2012) 'Heavy metal toxicity and the environment', *National institutes of health*, 101, pp. 1–30.
- Tedersoo, L., Suvi, T., Jairus, T. and Ostonen, I. (2009) 'Revisiting ectomycorrhizal fungi of the genus *Alnus*: differential host specificity, diversity and determinants of the fungal community', *New Phytologist*, 182, pp. 727–735.
- Turnau, K., Kottke, I. and Dexheimer, J. (1996) 'Toxic element filtering in *Rhizopogon roseolus*/*Pinus sylvestris* mycorrhizas collected from calamine dumps', *Mycological Research*, 100(1), pp. 16–22.
- Turnau, K., Mleczko, P., Blaudez, D., Chalot, M. and Botton, B. (2002) 'Heavy metal binding properties of *Pinus sylvestris* mycorrhizas from industrial wastes', *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, pp. 253–261.
- Turnau, K., Przybylowicz, W. J. and Mesjasz-Przybylowicz, J. (2001) 'Heavy metal distribution in *Suillus luteus* mycorrhizas - As revealed by micro-PIXE analysis', *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research, Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, 181(1–4), pp. 649–658.
- Upton, R., Read, D. J. and Newsham, K. K. (2009) 'Nitrogen form influences the response of *Deschampsia antarctica* to dark septate root endophytes', *Mycorrhiza*, 20, pp. 1–11.
- Urban, A., Puschenreiter, M., Strauss, J. and Gorfer, M. (2008) 'Diversity and structure of ectomycorrhizal and co-associated fungal communities in a serpentine soil', *Mycorrhiza*, 18(6–7), pp. 339–354.
- Vandecasteele, B., Samyn, J., De Vos, B. and Muys, B. (2008) 'Effect of tree species choice and mineral capping in a woodland phytostabilisation system: A case-study for calcareous dredged sediment landfills with an oxidised topsoil', *Ecological Engineering*, 32(3), pp. 263–273.

- Walker, J. K. M., Cohen, H., Higgins, L. M., Kennedy, P. G. and Kennedy, P. G. (2014) 'Testing the link between community structure and function for ectomycorrhizal fungi involved in a global tripartite symbiosis', *New Phytologist*, 202, pp. 287–296.
- Wall, L. G. (2000) 'The Actinorrhizal Symbiosis', *Journal of Plant Growth Regulation*, 19, pp. 167–182.
- Wang, S. and Shi, X. (2001) 'Molecular mechanisms of metal toxicity and carcinogenesis', *Molecular and Cellular Biochemistry*, 222(1–2), pp. 3–9.
- WHO (1991) Nickel, International Progress Chemical Safety, Environmental Health Criteria. World Health Organization, Geneva. Available at: <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc108.htm>
- WHO (1998) Copper, World Health Organization, Geneva. Available at: <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc200.htm>
- WHO (2001) 'Environmental Health Criteria 224 Arsenic and Arsenic Compounds (Second Edition)', World Health Organization Geneva, pp. 1–66. Available at: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/42366/1/WHO_EHC_224.pdf.
- Wong, M. (2003) 'Ecological restoration of mine degraded soils, with emphasis on metal contaminated soils', *Chemosphere*, 50(6), pp. 775–780.
- Wu, B., Nara, K. and Hogetsu, T. (2002) 'Spatiotemporal transfer of carbon-14-labelled photosynthate from ectomycorrhizal *Pinus densiflora* seedlings to extraradical mycelia', *Mycorrhiza*, 12(2), pp. 83–88.
- Xu, R., Li, T., Cui, H., Wang, J., Yu, X., Ding, Y., Wang, C., Yang, Z. and Zhao, Z. (2015) 'Diversity and characterization of Cd-tolerant dark septate endophytes (DSEs) associated with the roots of Nepal alder (*Alnus nepalensis*) in a metal mine tailing of southwest China', *Applied Soil Ecology*. Elsevier B.V., 93, pp. 11–18.

Yang, X., Feng, Y., He, Z. and Stoffella, P. J. (2005) 'Molecular mechanisms of heavy metal hyperaccumulation and phytoremediation', *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 18(4), pp. 339–353.

Yokoi, K., Uthus, E. O. and Nielsen, F. H. (2003) 'Nickel deficiency diminishes sperm quantity and movement in rats', *Biological Trace Element Research*, 93(1), pp. 141–54.

Yoshida, T., Yamauchi, H. and Fan Sun, G. (2004) 'Chronic health effects in people exposed to arsenic via the drinking water: Dose-response relationships in review', *Toxicology and Applied Pharmacology*, 198(3), pp. 243–252.

Zaccone, C., Soler-Rovira, P., Plaza, C., Cocozza, C. and Miano, T. M. (2009) 'Variability in As, Ca, Cr, K, Mn, Sr, and Ti concentrations among humic acids isolated from peat using NaOH, Na₄P₂O₇ and NaOH + Na₄P₂O₇ solutions', *Journal of Hazardous Materials*, 167(1–3), pp. 987–994.

Zhang, Y., Li, T. and Zhao, Z. (2013) 'Colonization Characteristics and Composition of Dark Septate Endophytes (DSE) in a Lead and Zinc Slag Heap in Southwest China', *Soil and Sediment Contamination: An International Journal*, 22(5), pp. 532–545.